

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Věra Chvalová

**Role proteinu RACK1 v regulaci translace za stresových podmínek**  
**Role of RACK1 in translation regulation during stress conditions**

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Groušl, Ph.D.

Praha, 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 8. 2020

Podpis:

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala především mému školiteli Tomáši Groušlovi za vždy pozitivní přístup, trpělivost a čas, který mi věnoval v průběhu práce na diplomovém projektu. Ostatním členům laboratoře děkuji za přátelskou atmosféru. Děkuji mé rodině za materiální a psychickou podporu během celého studia. Také děkuji Martinovi za všechno, co pro mě nejen během studia udělal.

## Abstrakt

RACK1 (Receptor pro aktivovanou proteinkinázu C 1) je evolučně konzervovaný protein s esenciální rolí ve všech studovaných eukaryotických organismech, kromě kvasinek. RACK1 byl původně popsán jako vazebný partner proteinkinázy C, ale dnes už je známa jeho významná role v dalších buněčných signalizacích, jako např. MAPK, Src nebo FAK. Díky tomu se RACK1 podílí na regulaci klíčových buněčných procesů včetně migrace, apoptózy či translace.

Jako vazebný partner malé ribozomální podjednotky přispívá RACK1 k regulaci translace zprostředkováním přenosu signálů mezi buněčnými drahami a některými komponenty translace, např. mezi PKC a eIF6. RACK1 má také funkci v translaci za stresových podmínek. Během stresu dochází k poklesu celkové úrovně translace, k syntéze specifických mRNA významných pro buněčnou odpověď na stres a zároveň k formování cytosolických útvarů zvaných stresové granule (SG). Stresové granule slouží k ochraně mRNA a translačních komponent před degradací a zároveň brání vstupu buňky do apoptózy. RACK1 byl identifikován jako jedna z mnoha komponent přítomných v SG. Lokalizace RACK1 do SG má za následek inhibici pro-apoptotických signálních drah regulovaných tímto proteinem.

Cílem této diplomové práce bylo přispět k bližšímu objasnění role RACK1 v translaci obecně i za stresových podmínek. Experimenty probíhaly na námi připravených MDCK buněčných liniích exprimujících nižší množství RACK1 či mutantní formy tohoto proteinu. Doposud dosažené výsledky poukazují na určitou funkci RACK1 v dělení a růstu MDCK buněk. Detailní analýza role RACK1 v translaci bude předmětem dalšího výzkumu.

**Klíčová slova:** RACK1; regulace translace; stresové granule; buněčná signalizace

## **Abstract**

RACK1 (Receptor for activated C kinase 1) is an evolutionary conserved protein which has essential role in most studied eukaryotic organisms, except for yeast. Although RACK1 was originally described as a binding partner of protein kinase C, later studies revealed its significant role in other cellular signalizations such as MAPK, Src or FAK. Thanks to this, RACK1 participates in the regulation of key cellular processes including migration, apoptosis or translation.

As a binding partner of a small ribosomal subunit, RACK1 contributes to translation regulation by integrating signals from different cellular pathways and several translational components such as PKC and eIF6. Moreover, RACK1 has a role in translation regulation during stress. Under stress conditions there is a global reduction of translation, increased expression of specific mRNAs important for cellular stress response and formation of cytosolic foci called stress granules (SGs). SGs play an important role in protection of mRNAs and translation components against degradation. SGs also function in prevention of apoptosis. RACK1 has been identified as one of many components of SGs and its localization into SGs leads to inhibition of RACK1-mediated pro-apoptotic pathways.

Aim of this diploma thesis was to elucidate the role of RACK1 in translation under physiological and stress conditions. We produced several MDCK cell lines expressing either reduced amount of wild type RACK1 or expressing its mutant forms, which were further used in follow-up experiments. Our results so far indicate that RACK1 has a role in division and growth of MDCK cells. Detailed analysis of RACK1 role in translation will be the subject of future research.

**Key words:** RACK1; translation regulation; stress granules; cellular signalization

# Obsah

<b>Seznam zkratek .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Úvod .....</b>	<b>11</b>
<b>2. Přehled literatury .....</b>	<b>12</b>
2.1. Translace .....	12
2.1.1. Stresové podmínky a translace.....	13
2.1.1.1. Regulace translace pomocí eIF2 $\alpha$ fosforylace.....	14
2.1.1.2. Regulace translace pomocí eIF4EBP1 fosforylace .....	16
2.2. Stresové granule .....	16
2.2.1. Složení a vznik stresových granulí.....	17
2.2.2. Role stresových granulí.....	19
2.3. RACK1.....	20
2.3.1. WD40 rodina .....	22
2.3.2. Struktura RACK1 .....	22
2.3.3. Funkce RACK1 v buňce .....	24
2.3.3.1. Role RACK1 v signalizaci.....	24
2.3.3.2. Role RACK1 v translaci .....	25
2.3.3.3. RACK1 a SG .....	26
2.3.3.4. Role RACK1 v biologických procesech .....	27
<b>3. Cíle práce.....</b>	<b>28</b>
<b>4. Materiál a metody .....</b>	<b>29</b>
4.1. Materiál .....	29
4.1.1. Buněčné linie .....	29
4.1.2. Seznam plazmidů.....	30
4.1.3. Seznam deoxyoligonukleotidů.....	30
4.1.4. Seznam enzymů .....	31
4.1.5. Seznam primárních protilátek .....	31
4.1.6. Seznam sekundárních protilátek .....	31
4.2. Metody .....	32
4.2.1. Kultivace buněk .....	32
4.2.2. Kryokonzervace a rozmrazování buněk .....	32

4.2.3. Mikroskopie živých buněk.....	32
4.2.4. Imunofluorescenční mikroskopie.....	32
4.2.5. Stresování buněk.....	33
4.2.6. Příprava lyzátů a SDS PAGE.....	33
4.2.7. Western Blot.....	34
4.2.8. Imunoprecipitace .....	35
4.2.9. Polyzomové profily.....	35
4.2.10. Polymerázová řetězová reakce (PCR), restrikce a ligace DNA .....	36
4.2.11. Agarózová elektroforéza, extrakce DNA z gelu .....	37
4.2.12. Konstrukce plazmidového vektoru, replikace plazmidu v bakteriích, izolace plazmidů .....	38
4.2.13. Transfekce vektorů do buněk .....	38
4.2.14. Sekvenování .....	38
<b>5. Výsledky.....</b>	<b>39</b>
5.1. Příprava a analýza MDCK buněčných linií vykazujících sníženou expresi RACK1 (RACK1 KD) .....	39
5.1.1. Příprava buněčné linie s deplecí RACK1 s využitím metody CRISPR/Cas-9.....	39
5.1.2. Studium morfologie RACK1 KD linie.....	42
5.1.3. „Rescue“ RACK1 KD linie.....	44
5.1.4. Tvorba stresových granulí (SG) u RACK1 KD linie.....	45
5.1.5. Analýza translace linie za stresu – polyzomové profily .....	47
5.1.6. Analýza translace linie za stresu - úroveň fosforylace eIF2 $\alpha$ .....	49
5.1.7. Shrnutí .....	49
5.2. Příprava a analýza MDCK linie exprimující lidskou variantu RACK1 fúzovanou s GFP ..	50
5.2.1. Příprava stabilní linie exprimující caRACK1 a hRACK1-GFP (WT):.....	50
5.2.2. Příprava stabilní linie exprimující pouze hRACK1-GFP (WT).....	51
5.2.3. Morfologie MDCK buněk exprimujících pouze hRACK1-GFP .....	53
5.2.4. Tvorba stresových granulí u MDCK linie exprimující pouze hRACK1-GFP .....	54
5.2.5. Shrnutí .....	56
5.3. Příprava a analýza MDCK linie exprimující hRACK1-GFP S278A .....	57
5.3.1. Příprava stabilní linie exprimující caRACK1 a hRACK1-GFP S278A.....	58
5.3.2. Tvorba stresových granulí u linie exprimující caRACK1 a hRACK1-GFP S278A ....	58

5.3.3. Ověření přítomnosti O-GlcNAc modifikace u hRACK1-GFP S278A .....	60
5.3.4. Shrnutí .....	61
<b>6. Diskuze.....</b>	<b>62</b>
6.1. Buněčná linie se sníženou expresí RACK1 (RACK1 KD) .....	62
6.2. Buněčné linie exprimující hRACK1-GFP .....	65
6.2.1. caRACK1 WT/hRACK1-GFP WT .....	65
6.2.2. caRACK1 KO/hRACK1-GFP WT .....	66
6.2.3. hRACK1-GFP S278A.....	68
6.2.4. caRACK1 KO/hRACK1-GFP R36D K38E .....	69
6.3. MORG1 .....	70
<b>7. Závěr.....</b>	<b>72</b>
<b>8. Přehled literatury .....</b>	<b>73</b>



## Seznam zkratek

ALS	Amyotrophic lateral sclerosis
APS	Ammonium persulfate
Asc1p	Absence of growth suppressor of Cyp1
ATF4	Activating transcription factor 4
ATP	Adenosine triphosphate
B-LCL	B-Lymphoblastoid Cell Line
BPAN	Beta-propeller protein-associated neurodegeneration
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	Cyclic AMP
CDK1	Cyclin dependent kinase 1
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeat
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
eIF	Eukaryotic initiation factor
eIF4EBP1	eIF4E binding protein 1
ER	Endoplasmic reticulum
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
G3BP1	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1
GCN2	General control nonderepressible 2
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GFP	Green fluorescent protein
GTP	Guanosine triphosphate
HA	Hemagglutinin
HEPES	Hydroxyethyl-piperazineethane-sulfonic acid buffer
HRP	Horseradish peroxidase
HRI	Heme-regulated inhibitor
IRES	Internal ribosome entry site
JNK	c-Jun N-Terminal kinase
KD	Knockdown
KO	Knockout
MAPK	Mitogen activated protein kinase

MDCK	Madin-Darby canine kidney
MTK1	MAP Three Kinase 1
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NTF2	Nuclear transport factor 2
O-GlcNAc	O-linked $\beta$ -N-acetylglucosamine glycosylation
ORF	Open reading frame
PABP	Poly-A binding protein
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PB	Processing body
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PERK	PKR-like endoplasmic reticulum kinase
PFA	Paraformaldehyde
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PKR	Protein kinase RNA-activated
PRD	Proline-rich sequence recognition domain
RACK1	Receptor for activated C kinase 1
caRACK1	canine RACK1
hRACK1	human RACK1
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleic acid
gRNA	guide RNA
mRNA	messenger RNA
rRNA	ribosomal RNA
siRNA	small interfering RNA
tRNA	transfer RNA
RSK	Ribosomal s6 kinase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SG	Stress granule
TDP-43	Transactive response DNA-binding protein 43
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TIA-1	T-cell-restricted intracellular antigen-1
UPR	Untranslated protein response
WB	Western Blot
WDR45	WD repeat domain 45
WIPI4	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 4
WT	Wild type

# 1. Úvod

Život je plný stresu. Jedním z důvodů evolučního úspěchu savců i dalších mnohobuněčných organismů je jejich výjimečná schopnost přizpůsobit se stresujícím změnám v okolním prostředí. Každá buňka je neustále vystavena různým formám vnějších i vnitřních, více či méně intenzivních podnětů, na něž musí odpovídajícím způsobem reagovat. Tato reakce na měnící se a stresové podmínky zahrnuje mnoho mechanismů včetně snížení úrovně translace, což buňkám umožní úsporu energie a zároveň syntézu pouze specifických proteinů, přispívajících k ochraně buňky před následky stresu.

Další adaptace, která se objevuje v reakci na stresové podmínky, je tvorba stresových granulí v cytosolu buňky. V těchto nemembránových útvech se hromadí pozastavené translační iniciační komplexy, tedy mRNA a řada proteinů, a tím jsou chráněné před degradací či poškozením. Zároveň zde dochází i k určitému třídění přítomných mRNA molekul a rozhodování o jejich konečném osudu. Po odeznění stresu se tyto granule rozpouští a umožní buňce pokračovat v započaté translaci. Může se však stát, že působení stresu je tak rozsáhlé, že buňka se raději rozhodne podstoupit apoptózu, tedy programovanou buněčnou smrt.

V této diplomové práci se zabývám právě translací a její regulací (nejen) během stresových podmínek. Zároveň jsem se zaměřila na studium RACK1 (receptor pro aktivovanou proteinkinázu C), významného proteinu zapojeného nejen do regulace translace, ale i do dalších významných buněčných procesů. RACK1 je rovněž jednou z komponent stresových granulí. Cílem této diplomové práce bylo přispět k pochopení jeho konkrétní role v translaci a v dynamice stresových granulí, která ještě není úplně objasněná.

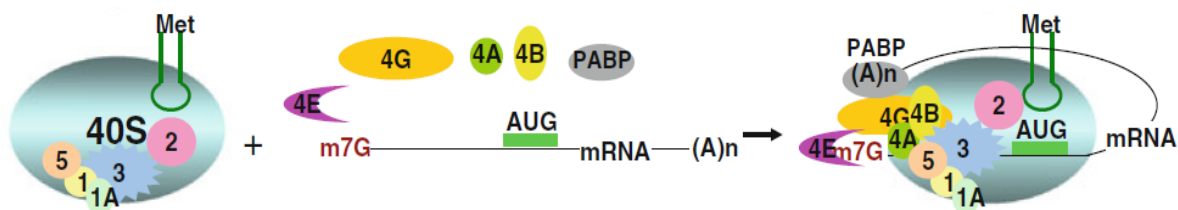
Studium úlohy RACK1 v translaci, stresových granulích, ale i v dalších buněčných procesech je zajímavé i z biomedicínského hlediska. Narušení regulace mechanismů, kterých se RACK1 účastní, totiž často souvisí s patologickými procesy vedoucími k mnoha onemocněním (např. nádorovým). Rovněž vliv RACK1 na složení a dynamiku stresových granulí není dosud příliš studován. Stresové granule hrají klíčovou roli v odpovědi buněk na stres a jejich přežívání. Narušení dynamiky stresových granulí je spojováno s neurodegenerativními chorobami i nádorovými onemocněními.

## 2. Přehled literatury

### 2.1. Translace

Regulace translace mRNA do proteinů hraje zásadní roli v regulaci genové exprese. Kontrola proteosyntézy umožňuje buňce nejen udržování homeostáze nebo správný průběh růstu a diferenciaci, ale i odpověď na měnící se či stresové podmínky. Odchytky v tomto procesu mohou vést k řadě onemocnění. Na rozdíl od transkripční regulace genové exprese, regulace translace umožňuje téměř okamžité změny v koncentraci požadovaných proteinů, a tedy i rychlejší odpověď buňky na aktuální podmínky. Ačkoli může tato regulace probíhat ve všech fázích translace, klíčovou roli zde hraje fáze iniciace. V eukaryotických buňkách jde o velice komplexní proces, vyžadující účast velkého množství iniciačních faktorů a dalších proteinů.

Za fyziologických podmínek bývá iniciace translace obecně zahájena rozpoznáním struktury tzv. čepičky (7-methylguanosin) na 5'konci mRNA iniciačním faktorem eIF4E (známým také jako „cap-binding protein“). Spolu s eIF4A a eIF4G tvoří eIF4E komplex zvaný eIF4F. Na opačný konec mRNA se váže poly-A-vazebný protein, který interakcí s eIF4G způsobí cirkularizaci mRNA (tento mechanismus ale neplatí univerzálně pro všechny mRNA) a usnadňuje rovněž vazbu eIF4F na čepičku. Zároveň dojde k vytvoření tzv. 43S preiniciačního komplexu, a to asociací malé ribozomální podjednotky s iniciačními faktory eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3 a eIF5. Na eIF2 s navázaným GTP je připojená iniciátorová tRNA nesoucí aminokyselinu methionin. Díky interakci eIF4F s faktory 43S preiniciačního komplexu je umožněna vazba malé ribozomální podjednotky na 5'konec mRNA a dojde k vzniku 48S preiniciačního komplexu. Poté probíhá tzv. skenování mRNA směrem k jejímu 3'konci, kdy 48S preiniciační komplex hledá v nukleotidové sekvenci iniciační kodon (ve většině případů se jedná o AUG). Po nalezení iniciačního kodonu dojde k uvolnění iniciačních faktorů, vzniku iniciačního komplexu připojením velké ribozomální podjednotky a zahájení elongační fáze translace syntézou první peptidové vazby (viz obr. 1) (Hershey *et al.*, 2012; Sonenberg a Hinnebusch, 2009).



**Obrázek 1: Iniciace translace u eukaryot.** Zobrazen preiniciační komplex v podobě malé (40S) ribozomální podjednotky v interakci s iniciačními faktory a iniciátorovou tRNA s navázaným methioninem. Spojením s mRNA obsahující 5' čepičku a 3' poly(A) konec, s dalšími iniciačními faktory a PABP vznikne 48S komplex schopný skenování mRNA. Po nalezení iniciačního kodonu (AUG) se iniciační faktory uvolní, připojí se velká ribozomální podjednotka (není zobrazena) a vznikne iniciační komplex (převzato z: Malys a McCarthy, 2011).

### 2.1.1. Stresové podmínky a translace

Na stresové podmínky mohou buňky odpovídat mnoha způsoby, od mechanismů vedoucích k přežití až po iniciaci buněčné smrti, snižující riziko velkého výskytu poškozených buněk v organismu. Který ze způsobů si buňka zvolí, závisí na mnoha faktorech jako je délka a povaha stresu či konkrétní buněčný typ. Obecně však platí, že v reakci na nepříznivé podmínky buňka nejprve iniciuje mechanismy vedoucí k její ochraně před stresem a zotavení se z jeho následků. Teprve pokud stres překročí pro buňku únosnou mez, ať už dobou trvání či intenzitou, dojde k aktivaci mechanismů vedoucích až k programované buněčné smrti.

Jednou z nejčastějších buněčných odpovědí na stresové podmínky je tzv. „heat shock response“ (odpověď na tepelný šok). Tento mechanismus byl původně popsán jako reakce buňky na zvýšení teploty o 3-5 °C nad optimum pro daný organismus (Lindquist, 1986), ale ukázalo se, že se objevuje i jako odpověď na oxidativní stres či přítomnost těžkých kovů. Jeden z hlavních následků těchto typů stresu je hromadění poškozených a špatně sbalených proteinů. V reakci na to buňka zvýší expresi chaperonů zajišťujících opětovné správné složení těchto proteinů (Fulda *et al.*, 2010).

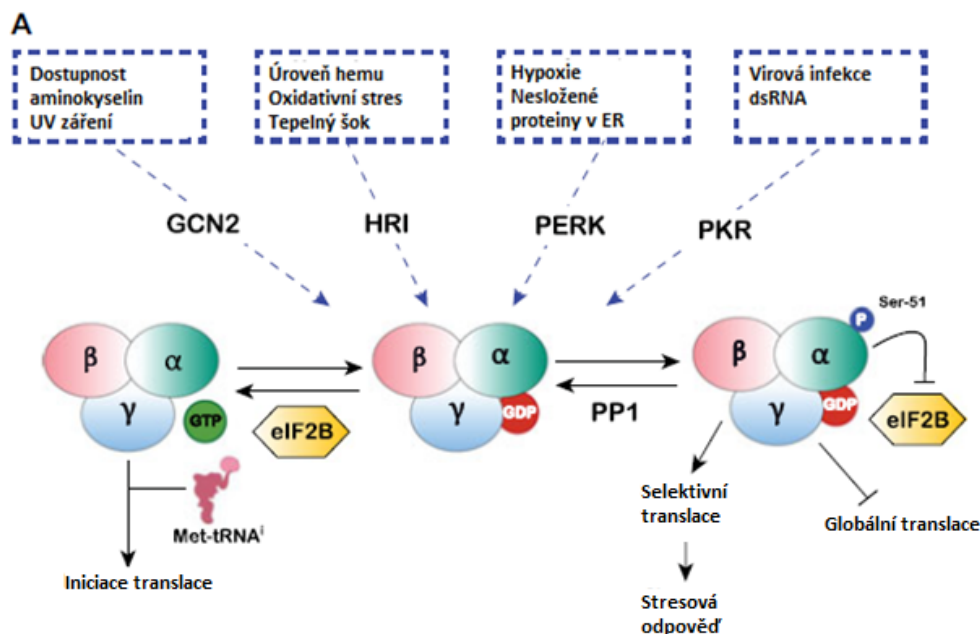
Syntéza chaperonů a dalších specifických proteinů podílejících se na ochraně buňky před následky působení stresu vyžaduje změny v iniciaci a průběhu translace. Je potřeba celkově snížit úroveň energeticky náročného procesu proteosyntézy a ušetřenou energii investovat do překladu právě specifických mRNA. Zároveň celková inhibice proteosyntézy snižuje riziko výskytu poškozených či špatně sbalených proteinů. Tohoto reprogramování translace je dosaženo především regulací funkce různých komponent zúčastněných ve fázi

iniciace translace. Nejstudovanější a pro tuto diplomovou práci nejvýznamnější cíle této regulace jsou iniciační faktory eIF2 a eIF4E (Advani a Ivanov, 2019).

#### **2.1.1.1. Regulace translace pomocí eIF2 $\alpha$ fosforylace**

Regulace aktivity heterotrimeru eIF2 $\alpha\beta\gamma$  spočívá ve fosforylaci jeho alfa podjednotky (eIF2 $\alpha$ ) specifickými, stresem aktivovanými kinázami. Za fyziologických podmínek zajišťuje eIF2 vazbu iniciační tRNA s methioninem na malou ribozomální podjednotku. Po rozpoznání iniciačního kodonu dojde k uvolnění eIF2 z komplexu, za využití energie z hydrolýzy GTP, navázaného na eIF2. Pro další kolo iniciace je poté třeba vyměnit GDP za GTP pomocí eIF2B, fungujícího jako GEF. Ovšem fosforylace aminokyseliny serinu (Ser-51) na eIF2 $\alpha$  brání této výměně nukleotidů, tím znemožní reaktivaci eIF2 a dojde tak k inhibici iniciace translace (viz obr. 2) (Advani a Ivanov, 2019; Knutsen *et al.*, 2015).

Fosforylaci eIF2 $\alpha$  zajišťují u savců čtyři různé kinázy, z nichž každá je aktivována jiným typem stresu. HRI kináza je aktivována v odpovědi na oxidativní stres způsobený např. sloučeninami arzeny, na nedostatek hemu a tepelný šok. V případě přítomnosti dvouvláknových RNA v buňce, značící virovou infekci, dojde k aktivaci kinázy PKR. Kináza PERK zodpovídá převážně za reakce na hypoxii a akumulaci nesložených proteinů v endoplazmatickém retikulu. Aktivace GCN2 je způsobena nedostatkem aminokyselin a UV zářením (viz obr. 2) (Advani a Ivanov, 2019; Proud, 2005).



**Obrázek 2: Fosforylace eIF2 $\alpha$  na Ser-51 stresem aktivovanými kinázami GCN2, HRI, PERK a PKR brání výměně GDP za GTP pomocí GEF eIF2B. Tím je znemožněna reaktivace komplexu eIF2 a dojde ke globální inhibici translace. Zároveň dochází k selektivní translaci mRNA zodpovědných za modulaci stresové odpovědi (Převzato z: Advani a Ivanov, 2019, upraveno).**

Fosforylace eIF2 $\alpha$  v reakci na stresové podmínky způsobí celkovou inhibici proteosyntézy v buňce, zároveň však dojde ke zvýšení úrovně translace vybraných mRNA. Tyto specifické mRNA obsahují krátký otevřený čtecí rámec ve své 5' nepřekládané oblasti a pro iniciaci translace nevyžadují rozpoznání struktury čepičky komplexem eIF4F. Místo toho u většiny z nich dochází k přímému nasednutí ribozomu do tzv. vnitřního místa vazby ribozomu (IRES). Mezi proteiny vznikající za stresu z těchto specifických mRNA patří např. ATF4, významný transkripční faktor regulující transkripci genů kódujících např. chaperony a další proteiny, které zajišťují odpovídající reakci buňky na stres (Chan *et al.*, 2013).

Následná defosforylace eIF2 $\alpha$  specifickými fosfatázami po odeznění stresu způsobí návrat proteosyntézy na původní úroveň. Bylo však zjištěno, že fosforylace eIF2 $\alpha$  není vždy nutně vyžadována pro celkové snížení proteosyntézy a zároveň tato fosforylace nemusí přímo vést k inhibici translace (Boye a Grallert, 2020). Například po expozici UV záření došlo v kvasinkových i myších buňkách k inhibici translace nezávisle na eIF2 $\alpha$  fosforylaci (Knutsen *et al.*, 2015).

Konečný osud buňky závisí na intenzitě a délce trvání nepříznivých podmínek. Pokud stres není příliš silný, po určité době odezní a nedojde mezitím k překročení kapacity adaptivních mechanismů buňky, úroveň proteosyntézy se vrátí do původního stavu. V opačném případě však dojde k aktivaci dalších mechanismů vedoucích nakonec k programované buněčné smrti (Pakos-Zebrucka *et al.*, 2016).

#### **2.1.1.2. Regulace translace pomocí eIF4EBP1 fosforylace**

Protein eIF4EBP1 brání interakci s eIF4E tvorbě komplexu eIF4F a tím funguje jako represor translace. Za optimálních podmínek je eIF4EBP1 fosforylován a tato modifikace znemožňuje jeho vazbu na eIF4E. Velký význam v regulaci funkce eIF4EBP1 pomocí fosforylace má komplex mTORC1, ale i např. MAP kinázy, CDK1 a další. Za stresových podmínek jsou dráhy vedoucí k fosforylaci eIF4EBP1 inhibovány, dojde k defosforylaci eIF4EBP1, jeho vazbě na eIF4E a tím k inhibici translace. Ovšem interakce eIF4EBP1 s eIF4E nemusí být ve všech případech podmínkou pro inhibici translace (Feigenblum a Schneider, 1996; Advani a Ivanov, 2019).

Zvýšená exprese eIF4EBP1 byla zjištěna v mnoha nádorových onemocněních, jako je např. karcinom prsu či hepatocelulární karcinom (Yin-Lian Cha *et al.*, 2015; Rutkovsky *et al.*, 2019). Ta je pravděpodobně způsobena stresem, který nádorové buňky zažívají. Aktivované onkogenní signalizace, v tomto případě dráha PI3K-AKT-mTOR, poté způsobí fosforylaci eIF4EBP1 a ten, přestože je v buňce akumulován ve větším množství, není schopen inhibovat translaci (Martineau *et al.*, 2013).

### **2.2. Stresové granule**

Změny v buněčném metabolismu jako odpověď na stresové podmínky zahrnují řadu mechanismů vedoucích k ochraně a přežití buňky. Kromě výše popsaného reprogramování translace dochází zároveň k akumulaci pozastavených 48S preiniciačních komplexů ve specifických cytosolických útvech zvaných stresové granule (SG). Tato adaptace byla popsána u eukaryotických organismů včetně kvasinek, rostlin i savců a slouží nejen jako další kontrola úrovně proteosyntézy, ale působí rovněž jako ochrana transkriptů a dalších translačních komponent před degradací. Zároveň SG hrají určitou roli v regulaci apoptózy, a tedy i v rozhodování o konečném osudu buňky.



### 2.2.1. Složení a vznik stresových granulí

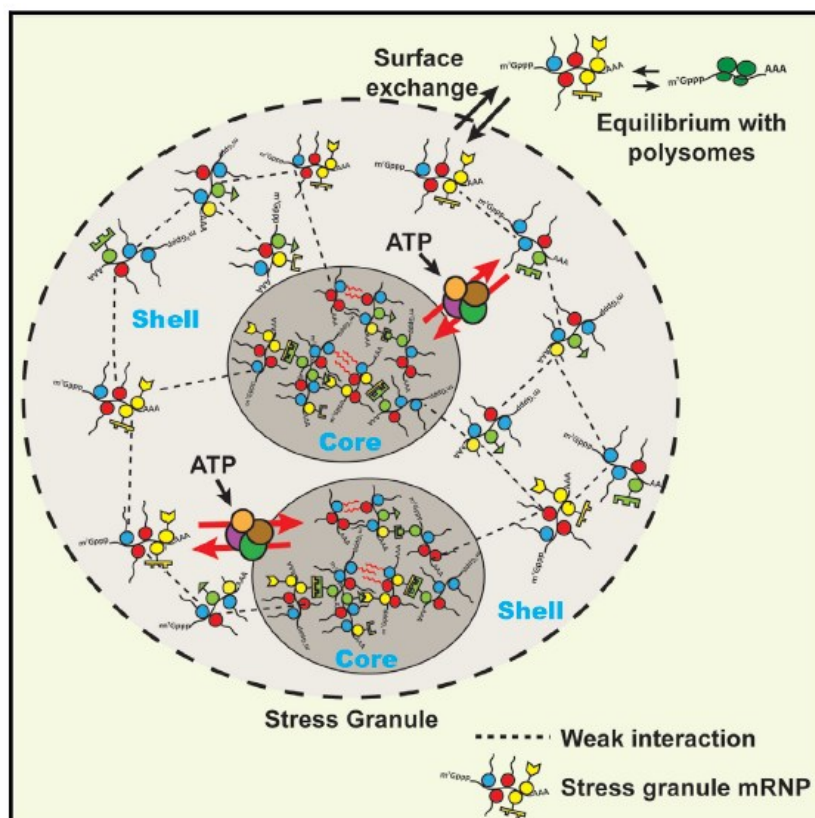
Stresové granule jsou velice dynamické struktury bez lipidové membrány, velké asi 100 nm – 1 µm v průměru (Niewidok *et al.*, 2018). Spolu s mRNA, pozastavenou ve fázi iniciace translace se zde hromadí iniciační faktory eIF3, eIF4F, eIF4B, dále malé (ale nikoli velké) ribozomální podjednotky a PABP-1. Tyto komponenty se vyskytují univerzálně ve všech SG. Dále se zde objevuje řada RNA-vazebných proteinů jako např. TIA-1, TIAR a G3BP, proteiny spojené s degradací RNA, např. argonaut či BRF1, dále RNA helikáza RCK (p54) nebo endonukleáza PMR1 (Anderson a Kedersha, 2008). Kromě zmíněných komponent se však v SG vyskytuje velká řada dalších, přičemž konkrétní složení a dynamika SG se může lišit v závislosti na typu přítomného stresu (Aulas *et al.*, 2017). Ze všech typů stresu, včetně např. osmotického, mitochondriálního, nebo stresu způsobeného virovou infekcí, UV zářením či nedostatkem živin, jsou nejvíce studované teplotní stres a oxidativní stres vyvolaný působením arzenu (ve formě arzenitanu sodného, NaAsO<sub>2</sub>) (Aulas a Vande Velde, 2015).

Vznik stresových granulí nastává (až na výjimky) několik minut po vystavení buňky stresovým podmínkám procesem zvaným fázová separace. Po případném odeznění stresu se SG stejně rychle rozpouští, přičemž obojí, vznik i rozpad SG, je aktivní proces vyžadující ATP (Jain *et al.*, 2016). Pro vznik SG však není vždy nutná přítomnost stresu. Klíčovou roli zde hraje pozastavení translace, což může být kromě stresových podmínek způsobeno i přidáním látek inhibujících translaci, případně snížením exprese specifických iniciačních faktorů či zvýšením exprese RNA-vazebných proteinů inhibujících translaci (Buchan a Parker, 2009).

Formování SG za stresových podmínek může být indukováno mnoha mechanismy, z nichž nejvýznamnější jsou mTOR signalizace (Sfakianos *et al.*, 2018), inhibice funkce mRNA helikázy eIF4A (Mazroui *et al.*, 2006, Dang *et al.*, 2006) či fosforylace eIF2α (Kedersha *et al.*, 1999). Také jiné posttranslační modifikace, nejen fosforylace, mají významný vliv na formování SG. Například modifikace řady proteinů pomocí O-GlcNAc („O-linked β-N-acetylglucosamine“) usnadňuje tvorbu SG (Ohn *et al.*, 2008), patrný vliv zde má i methyloace (Goulet *et al.*, 2008) nebo ubiquitinylace (Kwon *et al.*, 2007).

Ohledně složení SG převládá názor, podpořený výsledky ze superrozlišovací mikroskopie, že stresové granule ve své struktuře obsahují tzv. „core“ a kolem něj se tvoří tzv.

„shell“. „Core“ je přitom spíše stabilní struktura s vysokou koncentrací G3BP, PABP1 a mRNA, obklopená dynamičtější „shell“ s nižší hustotou komponent. Mezi „shell“ a okolním cytosolem zároveň probíhá neustálá výměna molekul zajištěná řadou proteinů a RNA-remodelačních komplexů (viz obr. 3) (Jain *et al.*, 2016).



**Obrázek 3:** Stresové granule (SG) jsou složeny ze stabilních „cores“ s větší koncentrací komponent, obklopených dynamičtější „shell.“ Skládání a dynamika SG jsou závislé na ATP (převzato z: Jain *et al.*, 2016).

Důležitou roli ve skládání SG má také přítomnost určitých interakčních domén u řady RNA-vazebných proteinů. Konkrétně se jedná o protein-protein interakční domény a protein-RNA interakční domény. Například protein TIA-1, který se významně podílí na vzniku SG, obsahuje ve své struktuře protein-protein interakční doménu PRD, umožňující agregaci těchto proteinů a jejich zapojení do tvorby SG. Po delecii této domény není TIA-1 schopen indukovat tvorbu SG (Gilks *et al.*, 2004). Podobně G3BP, další významný protein podílející se na formování SG, má ve své struktuře přítomnou NTF2-like doménu A, která hraje roli

v homo-oligomerizaci G3BP. Zároveň fosforylace Ser149 v B doméně G3BP brání této oligomerizaci. Na defosforylaci a následné umožnění G3BP tvořit SG má vliv Ras signalizace, která je aktivována mimo jiné přítomností oxidativního stresu. Protein-RNA vazebné domény v rámci těchto proteinů umožňují díky interakci s RNA samotný vznik SG (Tourrière *et al.*, 2003).

Významný podíl na tvorbě SG u vyšších eukaryot mají i mikrotubuly. Látky indukující depolymerizaci mikrotubulů zároveň inhibují tvorbu SG. Motorové proteiny kinesin a dynein byly detekovány jako součást SG a distribucí komponent SG podél mikrotubulů se rovněž podílejí na skládání i rozpadu SG (Ivanov *et al.*, 2003; Loschi *et al.*, 2009).

Konkrétněji můžeme vznik SG rozdělit do 5 fází. V 1. fázi dochází k pozastavení iniciace translace, rozpadu polyzomů a vzniku 48S mRNPs (ribonukleoproteiny). 2. fáze zahrnuje primární agregaci mRNA s RNA-vazebnými proteiny (např. G3BP, TIA-1), přičemž každý z těchto proteinů upřednostňuje vazbu specifických transkriptů a dochází k tzv. nukleaci. Ve 3. fázi nastává sekundární agregace zajištěná interakcemi mezi RNA-vazebnými proteiny a vznikají SG viditelné pod mikroskopem. Ve 4. fázi se do SG dostanou i proteiny postrádající schopnost vazby mRNA a to díky interakcím s již přítomnými proteiny a díky tomu dochází k integraci SG a některých signálních drah. V poslední fázi nastává třídění transkriptů, které jsou následně navázány na stabilizující proteiny v rámci SG či mimo ně, nebo naopak určeny k degradaci. Pomocí mnoha RNA-vazebných proteinů je zajištěna interakce mezi SG a processing bodies (PBs), podílejících se také na třídění a degradaci RNA. Některé transkripty mohou být navraceny zpět do polyzomů. Po odeznění stresu nastává v rámci několika minut rozpad SG a mRNPs se buď vrátí do procesu translace, nebo jsou degradovány (Anderson a Kedersha, 2008; Guzikowski *et al.*, 2019).

### **2.2.2. Role stresových granulí**

Vzhledem k jejich důležité funkci v ochraně buňky před následky stresu, hrají stresové granule významnou roli z biomedicínského hlediska. Narušení jejich dynamiky je spojováno s řadou neurodegenerativních onemocnění, jako jsou např. amyotrofická laterální skleróza (ALS) nebo Alzheimerova choroba. Určitá souvislost je zde i s nádorovými onemocněními.

Neurodegenerativní choroby jsou charakteristické trvalou přítomností oxidativního stresu a hromaděním nefunkčních či poškozených proteinů v buňce. V případě amyotrofické laterální sklerózy jsou u více než 95 % pacientů přítomny cytosolické shluky poškozeného RNA/DNA-vazebného proteinu TDP-43. Tento protein je za fyziologických podmínek preferenčně lokalizován v jádře, kde se podílí na regulaci metabolismu RNA. V degenerujících neuronech pacientů s ALS dochází díky mutacím v TDP-43 ke zvýšení jeho výskytu v cytosolu, kde následně podstupuje řadu posttranslačních modifikací a dochází také k jeho štěpení na menší fragmenty. To má za následek shlukování TDP-43 v cytosolu, a právě tyto shluky asociují s mnoha proteiny stresových granulí, např. s TIA-1. Zdá se, že tato asociace mutovaného TDP-43 a stresových granulí má vliv na dynamiku formování i rozpadu SG. Kromě TDP-43 však s tvorbou cytosolických agregátů asociujících s SG souvisí i jiné proteiny, např. FUS a řada dalších. Přesné molekulární mechanismy, kterými tyto mutované proteiny a samotné stresové granule přispívají k patogenezi ALS a dalších neurodegenerativních onemocnění však stále nejsou zcela objasněny (Li *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2020; Mitra a Hegde, 2020).

Mnoho komponent stresových granulí se také účastní signálních drah souvisejících s nádorovými onemocněními. Bylo objeveno, že léčba některými chemoterapeutiky indukuje tvorbu SG (Gao *et al.*, 2019). Například Lapatinib, inhibitor tyrosinkináz využívaný k léčbě nádorů prsu, přispívá ke vzniku SG aktivovanému fosforylací faktoru eIF2 kinázou PERK. Experimenty, během nich byla po depleci PERK narušena tvorba SG, vedly ke zvýšení senzitivity nádorových buněk k této léčbě. Tvorba SG způsobená některými protinádorovými léky tedy pravděpodobně zajišťuje rezistenci těchto buněk k léčbě (Adjibade *et al.*, 2020). Je tedy zřejmé, že se SG určitým způsobem podílí na průběhu nádorových onemocnění. SG tak zároveň poskytují vhodný cíl protinádorové léčby.

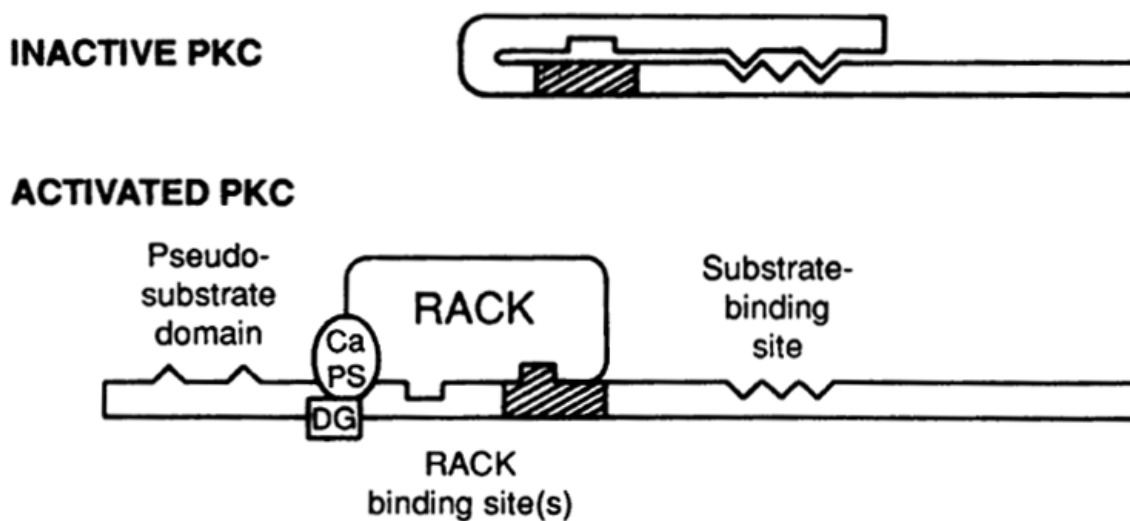
## 2.3. RACK1

Gen pro RACK1 byl původně naklonován z cDNA knihovny kuřecích jater a lidské B-LCL linie. Autoři studie z roku 1989 popisují purifikaci tohoto genu, nazvaného C12.3, jeho označení a hybridizaci s lidskou mRNA. Tím došlo k detekci 1.3 kb dlouhého transkriptu, naznačující existenci lidského genu vysoce homologního k C12.3. Tento gen byl dále izolován a označen jako H12.3. Sekvenací těchto dvou genů byla zjištěna jejich vysoká

homologie (86% identita v ORF) a po translaci dokonce 100% shoda v aminokyselinové sekvenci. Kromě toho byl součástí studie objev homologie v sekvenci aminokyselin u C/H12.3 a beta podjednotky lidského G-proteinu (Guillemot *et al.*, 1989).

Svůj současný název získal RACK1 až o několik let později, kdy byla objevena skupina proteinů schopných vázat aktivovanou PKC, označených jako receptory pro aktivovanou C-kinázu (RACK) (Mochly-Rosen *et al.*, 1991). Později byl blíže popsán jeden z nich, RACK1, jako protein vázající PKC za přítomnosti jejích aktivátorů (fosfatidylserin, diacylglycerol, vápenaté ionty), ale nikoli za jejich nepřítomnosti (viz obr. 4). RACK1 se vázal specificky pouze na PKC a tato vazba nebyla inhibována interakcí substrátu s katalytickým místem PKC (Ron *et al.*, 1994).

Výše zmíněné studie naznačily pravděpodobnost velkého významu RACK1 v signalizaci přes PKC. Postupně však začalo být jasné, že RACK1 se účastní i dalších buněčných procesů, nesouvisejících s touto signalizací (Chou *et al.*, 1999). Dnes je známo, že RACK1 je zapojen do velkého množství buněčných signálních drah a interaguje s mnoha různými vazebnými partnery, ať už přímo, nebo jako součást většího komplexu.



**Obrázek 4: RACK1 váže aktivovanou proteinkinázu C (PKC).** Nahoře je znázorněna neaktivní PKC složená do tohoto stavu díky interakci pseudo-substrátové domény s místem pro vazbu substrátu. Dole je vyobrazena aktivovaná PKC (za přítomnosti aktivátorů fosfatidylserinu, diacylglycerolu a vápenatých iontů) s proteinem RACK1 navázaným mimo místo vazby substrátu (převzato z: Mochly-Rosen *et al.*, 1991).

### 2.3.1. WD40 rodina

RACK1 je člen tzv. WD40 rodiny, významné a v evoluci konzervované skupiny proteinů. Asi nejvíce prostudovaným členem této rodiny je beta podjednotka G-proteinů, se kterou RACK1 sdílí významnou homologii. WD40 doména, typická pro proteiny této rodiny, obvykle sestává ze 7 opakování, z nichž každé směrem k C-konci obsahuje 40-60 aminokyselinyových zbytků končící motivem WD (tryptofan a kyselina asparagová) či jeho ekvivalentem (viz text níže a obr. 6). Tato opakování dohromady tvoří strukturu připomínající při pohledu shora vrtuli a z boku válec (viz kap. 2.3.2. „Struktura RACK1“ a obr. 5). Tato struktura umožňuje proteinům WD40 rodiny interakce s jinými molekulami. Členové této rodiny postrádají enzymatickou aktivitu, ale fungují jako scaffold proteiny (tedy proteiny, které vážou mnoho komponent signálních drah a umožňují jim mezi sebou interagovat), vytvářející funkční komplexy s důležitou rolí v mnoha významných procesech, jako je např. buněčná signalizace, regulace genové exprese, degradace proteinů či apoptóza (Zou *et al.*, 2016).

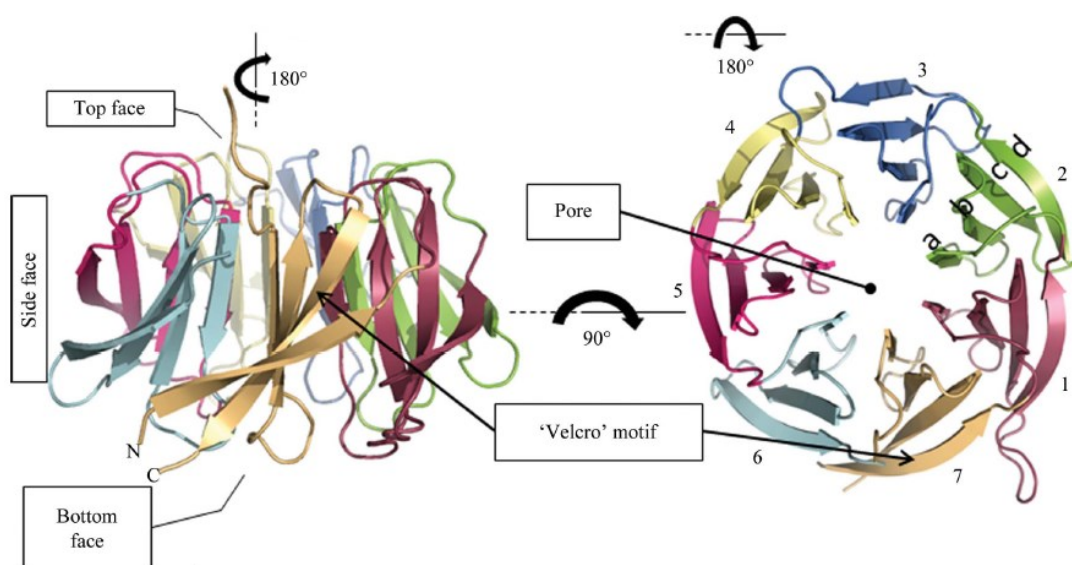
Díky účasti ve zmíněných esenciálních procesech souvisí proteiny WD40 rodiny s mnoha onemocněními; například mutace v genu pro WD40 protein WDR45/WIPI4 má za následek vznik dědičného neurodegenerativního onemocnění BPAN, které vede k opoždění vývoje pohybových i kognitivních schopností dítěte. Mentální úpadek zde přetrvává do dospělosti, přičemž se dále rozvíjí parkinsonismus, demence a dystonie. Molekulární podstata této choroby spočívá v absenci autofágie jakožto základní funkce proteinu WDR45/WIPI4. Následuje hromadění proteinů endoplazmatického retikula vedoucí k zahájení UPR a eventuálně k apoptóze neuronů (Wan *et al.*, 2019).

### 2.3.2. Struktura RACK1

První detailní studie organizace genu savčího RACK1 byla provedena na prasečím modelu, jež sdílí na proteinové úrovni téměř 100% identitu s homologními RACK1 u ostatních obratlovců (Chou *et al.*, 1999).

Pro tuto práci jsou významné dva ortology RACK1, lidský a psí. Lidský protein RACK1 je kódován genem GNB2L1 ležícím na chromozomu 5, psí varianta se nachází na chromozomu 11. Tyto geny obsahují 8 exonů a 7 intronů, a i přes odchylky v nukleotidové sekvenci dávají oba vzniknout proteinu o molekulové hmotnosti 36 kDa s identickou sekvencí dlouhou 317 aminokyselin (Adams *et al.*, 2011, Ensembl: [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

Jak již bylo zmíněno, struktura proteinu RACK1 je v evoluci konzervovaná, a to již od jednoduchých jednobuněčných eukaryot, až po rostliny a savce. Schopnost fungovat jako scaffold protein mu umožňuje jeho typická struktura tzv.  $\beta$ -vrtule („ $\beta$ -propeller“). Ta je složena ze 7 částí, z nichž každá je tvořena určitou sekvencí či opakováním („WD-repeat“), skládající se do struktury  $\beta$ -listu obsahujícího 4 antiparalelní vlákna. Mezi sousedícími  $\beta$ -listy vznikají hydrofobní interakce udílející celému proteinu stabilitu. Strukturní stabilita je dále zajištěna přítomností tzv. „velcro“ motivu, který propojuje N-konec s C-koncem polypeptidového řetězce (viz obr. 5) (Carrillo *et al.*, 2012).



**Obrázek 5: Zobrazení terciární struktury lidského RACK1.** Vlevo pohled z boku, vpravo pohled shora. Je vyznačen „velcro“ motiv propojující N-konec a C-konec polypeptidového řetězce, jednotlivé části struktury  $\beta$ -vrtule (očíslované 1-7 od N-konce proteinu) a 4 vlákna antiparalelního  $\beta$ -listu jsou označena a, b, c a d (převzato z Carrillo *et al.*, 2012).

Zmíněná opakování tvořící jednotlivé části  $\beta$ -vrtule jsou definována přítomností určitých dipeptidů na obou koncích těchto opakování. Konkrétně se jedná o dvojice glycín-histidin (GH) nacházející se směrem k N-konci sekvence a tryptofan-kyselina asparagová (WD), která leží směrem k C-konci. Aminokyseliny v sekvencích těchto dipeptidů však nejsou striktně konzervované a v řadě případů mohou být nahrazené jinými. U RACK1 se v některých opakováních místo kyseliny asparagové setkáme s lysinem, asparaginem a glutaminem, stejně tak motiv GH není přítomen ve všech opakováních (viz obr. 6) (Carrillo *et al.*, 2012; Adams *et al.*, 2011).

## Human RACK1

```
wd 1  MTEQMTLRGTLKGHNGWVTQIATTPQFPDMILSASRDKTIIMWKLTRD
wd 2  ETNYGIPQRALRGHSHFVSDVVISSDGQFALSGSWDGTLRLWDLTTG
wd 3  TTTRRFVGHTKDVLSVAFSSDNRQIVSGSRDKTIKLWNTLGVC
wd 4  KYTVQDESHSEWVSCVRFSPSSNPIVSCGWDKLVKVWNLANCKLK
wd 5  TNHIGHTGYLNTVTVPDSGLCASGGKDGQAMLWDLNEG
wd 6  KHLYTLDGGDIINALCFSPNRYWLCAATGPSIKIWDLEGKIIVDEL
wd 7  KQEVISTSSKAEPPQCTSLAWSADGQTLFAGYTDNLVRVWQVTIGTR
```

Obrázek 6: Sekvence lidského RACK1 se zobrazenými „WD-repeats“, definovanými sekvencemi ohraničenými GH a WD dipeptidy či jejich ekvivalenty (převzato z: Adams et al., 2011).

### 2.3.3. Funkce RACK1 v buňce

#### 2.3.3.1. Role RACK1 v signalizaci

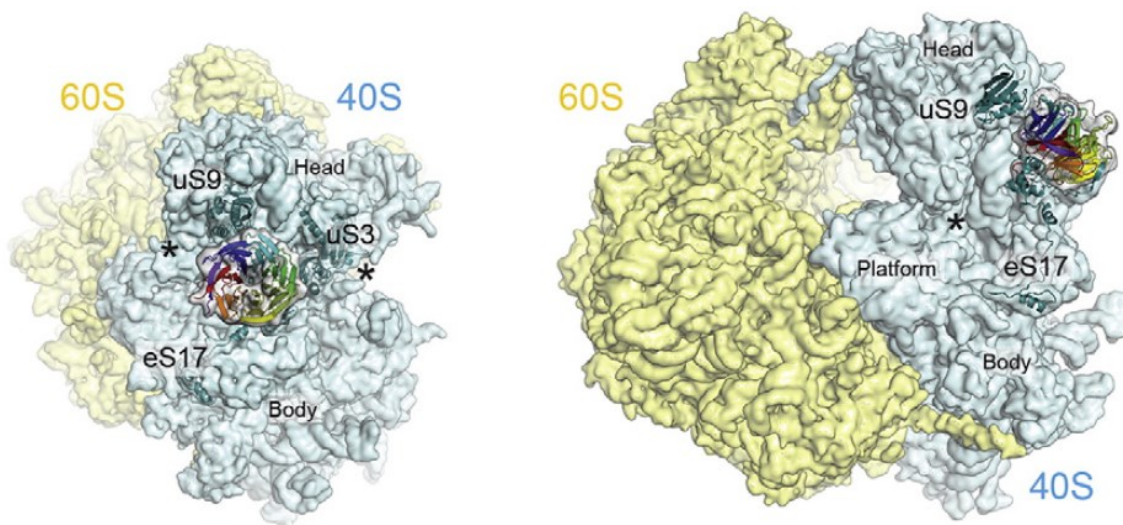
Vzhledem k tomu, že RACK1 byl poprvé identifikován jako vazebný partner PKC, existuje mnoho studií zabývajících se právě tímto vztahem. Byla potvrzena interakce RACK1 s různými izoformami PKC. Hlavním úkolem RACK1 v této interakci je stabilizovat aktivovanou PKC, umožnit jí translokaci a následnou fosforylaci odpovídajících substrátů a tím přenos signálu. RACK1 je také zapojen do komunikace mezi PKC a MAPkinázovými signálními drahami. Vedle PKC a MAPkináz však RACK1 interaguje s desítkami dalších molekul, jako jsou např. tyrosinkinázy Src a Fyn, některé proteiny účastnící se signalizace cAMP/PKA, 14-3-3 proteiny, nebo některé transmembránové receptory či receptorové tyrosinkinázy.

Úloha RACK1 tedy spočívá v ukotvení zmíněných i řady dalších proteinů na určitých místech v buňce, usnadnění přenosu signálu na následující členy signálních drah, umožnění komunikace mezi různými signálními drahami a stabilizace proteinové aktivity. V rámci vykonávání těchto funkcí se RACK1 může vyskytovat jak v cytosolu, tak i v jádře. Kromě toho má však RACK1 další významnou úlohu, která je zásadní pro tuto diplomovou práci: regulace translace. Tento protein byl identifikován i jako vazebný partner malé podjednotky ribozomu a je esenciální pro správný průběh translace mRNA (Adams *et al.*, 2011, Nielsen *et al.*, 2017).



### 2.3.3.2. Role RACK1 v translaci

RACK1 je popisován jako vazebný partner malé ribozomální podjednotky, případně přímo jako její součást a tato interakce je esenciální pro efektivní průběh proteosyntézy. Pozice vazby RACK1 na malou ribozomální podjednotku v místě poblíž výstupu mRNA je konzervována od kvasinek po člověka (Coyle *et al.*, 2009). Vazbu zajišťuje přítomnost pozitivně nabitých aminokyselin u RACK1, které interagují s 18S rRNA v rámci malé ribozomální podjednotky. Experimenty s RACK1 mutovaným v místech dvou aminokyselin klíčových pro tyto interakce (R36D K38E u savců, R38D K40E u kvasinek) značí neschopnost takto mutovaného RACK1 vázat se na ribozom (Sengupta *et al.*, 2004; Gallo *et al.*, 2018). Důležitou roli ve vazbě RACK1 na malou ribozomální podjednotku však hrají i další interakce, především mezi RACK1 a ribozomálním proteinem eS17 (viz obr. 7) (Nielsen *et al.*, 2017).



**Obrázek 7: Vazba RACK1 na malou ribozomální podjednotku (40S).** Pro tuto vazbu jsou významné nejen interakce mezi RACK1 a 18S rRNA, ale i mezi RACK1 a ribozomálními proteiny uS9, uS3 a eS17. Hvězdičky značí vstup a výstup mRNA (převzato z: Nielsen *et al.*, 2017).

Hlavní role RACK1 v translaci spočívá v přenosu signálu mezi členy mnoha signálních kaskád a proteiny zapojenými do procesu translace, např. některými iniciační faktory. Regulace translace pomocí PKC $\beta$ II, jedné z izoforem PKC, je závislá na její interakci s RACK1. *In vitro* bylo ukázáno zapojení komplexu RACK1-PKC např. do fosforylace a následného uvolnění eIF6 z 60S ribozomální podjednotky, která se následně může vázat na 40S

podjednotku a vytvořit ribozom během iniciace translace (Grosso *et al.*, 2008). Deplece RACK1 vedoucí k výraznému snížení úrovně translace závislé na mechanismu IRES naznačuje, že by mohl být zapojen spíše do regulace translace specifických mRNA (Majzoub *et al.*, 2014; LaFontaine *et al.*, 2019). V souvislosti s tím, RACK1 ortolog Asc1p v kvasinkových buňkách (*S. cerevisiae*) interaguje s proteinem Scp160p a tato interakce je důležitá pro vazbu Scp160p na polyzomy a pro regulaci translace specifických mRNA (Baum *et al.*, 2004). Kromě toho byla popsána také určitá role RACK1 v regulaci genové exprese pomocí miRNA. RACK1 zde přispívá k asociaci miRISC komplexu a translatujících ribozomů (Janot *et al.*, 2011). Na komplexní roli RACK1 v regulaci translace poukazuje také zjištění, že je tento protein mimo vazbu na ribozom nestabilní, což vede ke snížení úrovně globální translace a ve svém důsledku k narušení buněčného cyklu (Gallo *et al.*, 2018; Johnson *et al.*, 2019).

#### **2.3.3.3. RACK1 a SG**

RACK1 je za stresových podmínek přítomen ve stresových granulích, pravděpodobně díky jeho vazbě na 40S ribozomální podjednotku. Mutantní RACK1 deficientní ve vazbě na ribozom se v SG nevyskytuje (Arimoto *et al.*, 2008). Snaha zabránit vstupu stresované buňky do apoptózy regulované proteinem RACK1 je pravděpodobně hlavní důvod jeho lokalizace do SG. Poté, co je RACK1 přesunut do SG, dochází k inhibici pro-apoptotických MAPkinázových signálních drah p38 a JNK, ve kterých RACK1 hraje klíčovou roli jako scaffold. Známa je především interakce RACK1 s kinázou MTK1, která v reakci na stresové podmínky aktivuje právě signální dráhy p38 a JNK. Při depleci RACK1 je činnost MTK1 inhibována (Arimoto *et al.*, 2008).

Jak už bylo zmíněno, léčba některými chemoterapeutiky indukuje tvorbu SG, což způsobuje rezistenci buněk k protinádorové léčbě. Inhibice tvorby SG v těchto rezistentních buňkách zvyšuje jejich senzitivitu k podávaným lékům a zlepšuje účinnost terapie. Tento efekt je pravděpodobně způsoben, mimo jiné, inhibicí apoptózy způsobené lokalizací RACK1 do SG. Například u terapie morusinem, látkou způsobující aktivaci PKR a následnou fosforylaci eIF2 bylo zjištěno, že sekvestrace RACK1 do SG je zásadní pro rezistenci nádorových buněk proti této léčbě (Park *et al.*, 2020). Více o roli RACK1 v nádorových onemocněních je zmíněno v následující kapitole.

#### 2.3.3.4. Role RACK1 v biologických procesech

Díky své klíčové roli v tolika různých buněčných drahách je RACK1 zapojen do řady důležitých procesů jako je růst buňky, proliferace, migrace, adheze, diferenciace, imunitní odpověď či již popsaná apoptóza. U savců je RACK1 exprimován ve většině tkání a jeho exprese je vysoce regulovaná. Jedná se o esenciální protein eukaryot, mimo kvasinky (Gerbasí *et al.*, 2004). Chyby v regulaci jeho exprese či funkce mají často závažné následky v podobě např. vývojových abnormalit či vážných, zejména nádorových, onemocnění.

Jako protein s výrazným vlivem na regulaci zmíněných buněčných procesů se může RACK1 chovat jako onkogen a řadí se k diagnostickým markerům mnoha typů nádorových onemocnění. Kromě proliferace a migrace zde má vliv i např. na epitel-mesenchymální transici, angiogenezi či polaritu buněk. V různých typech nádorových buněk však může být role RACK1 odlišná a v některých případech dokonce zcela opačná (Duff *et al.*, 2017).

Například v případě melanomu, maligního nádorového onemocnění kůže, poukazuje zvýšená exprese RACK1 na špatnou prognózu. Experimentálním snížením exprese RACK1 pomocí siRNA dojde k výraznému poklesu růstu nádorových buněk, k inhibici migrace a invaze a k zahájení apoptózy těchto buněk (Shen *et al.*, 2020). Stejně tak u karcinomu prostaty má RACK1 výrazný vliv na proliferaci, migraci a invazi nádorových buněk a tím na růst nádoru a tvorbu metastáz (Shen *et al.*, 2013). Se zvýšenou expresí RACK1 a jeho pozitivním vlivem na proliferaci nádorových buněk se dále setkáme např. u karcinomu prsu (Cao *et al.*, 2010) nebo u nasofaryngeálního karcinomu (Wang *et al.*, 2018).

U jiných typů nádorových onemocnění, např. u některých nádorů žaludku a pankreatu, je však situace odlišná. V těchto případech naopak snížená exprese RACK1 souvisí se zvýšenou proliferací nádorových buněk a tvorbou metastáz, u karcinomu pankreatu zvýšená exprese RACK1 znamená lepší prognózu (Deng *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2019).

Z uvedených příkladů vyplývá, jak komplexní roli RACK1 v buňkách zaujímá.

### 3. Cíle práce

V rámci tohoto diplomového projektu jsme si stanovili jako hlavní cíl přispět k objasnění funkce RACK1 v translaci obecně a za stresových podmínek. K tomu bylo třeba stanovit si následující dílčí cíle:

- Příprava buněčných linií vykazujících různou míru exprese RACK1 či obsahujících mutované formy RACK1:
  - Zisk buněčných linií deficientních v expresi RACK1
  - Zisk buněčných linií exprimujících mutantní RACK1
    - mutace RACK1 v místě O-GlcNAc posttranslační modifikace
    - mutace RACK1 (R36D K38E) v místě vazby na ribozom
- Studium translační odpovědi v reakci na stres u těchto buněčných linií:
  - Vliv absence/deficience RACK1 na celkový fenotyp buněk a translaci
  - Analýza translační odpovědi pomocí polyzomových profilů a úrovně eIF2 $\alpha$  fosforylace
  - Tvorba stresových granulí po vystavení těchto buněk stresovým podmínkám (NaAsO<sub>2</sub>, teplotní stres)
  - Lokalizace RACK1 a jeho mutantních forem do stresových granulí

Jako model pro experimenty jsme si zvolili MDCK (Madin-Darby canine kidney) buňky, imortalizované buňky psího ledvinného jednovrstevného epitelu. Tato buněčná linie je v naší laboratoři dlouhodobě zavedena a umožňuje nám přípravu stabilních linií exprimujících různé varianty GFP-značeného RACK1. V přípravě těchto linií se využívá lidská varianta RACK1 s aminokyselinovou sekvencí shodnou s endogenní (psí) variantou RACK1. Zároveň genomické sekvence těchto dvou ortologů jsou odlišné, proto je u připravených linií možné následně použít CRISPR/Cas-9 pro delecí pouze endogenního RACK1 bez rizika zacílení sekvence pro lidský RACK1. Dále se zdá, že MDCK buňky celkově dobře snášejí heterologní expresi, proto jsou vhodné pro naše experimenty.

## **4. Materiál a metody**

### **4.1. Materiál**

#### **4.1.1. Buněčné linie**

##### **MDCK linie (caRACK1 WT)**

- nemodifikovaná linie Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) buněk (Tissue culture core facility, University of Virginia)
- imortalizované buňky psího ledvinného jednovrstevného epitelu

##### **caRACK1 +/- (RACK1 KD)**

- linie MDCK buněk se sníženou expresí RACK1

##### **caRACK1 WT/hRACK1-GFP WT**

- linie MDCK buněk exprimující endogenní RACK1 a zároveň lidskou variantu RACK1 fúzovanou s GFP

##### **caRACK1 WT/hRACK1-GFP S278A**

- linie MDCK buněk exprimující endogenní RACK1 a zároveň mutovanou lidskou variantu RACK1 fúzovanou s GFP

##### **caRACK1 WT/hRACK1-GFP R36D K38E**

- linie MDCK buněk exprimující endogenní RACK1 a zároveň mutovanou lidskou variantu RACK1 fúzovanou s GFP

##### **caRACK1 KO/hRACK1-GFP WT**

- linie MDCK buněk exprimující pouze lidskou variantu RACK1 fúzovanou s GFP

##### **caRACK1 KO/hRACK1-GFP S278A**

- linie MDCK buněk exprimující pouze mutovanou lidskou variantu RACK1 fúzovanou s GFP

##### **caRACK1 KO/hRACK1-GFP R36D K38E**

- linie MDCK buněk exprimující pouze mutovanou lidskou variantu RACK1 fúzovanou s GFP

#### 4.1.2. Seznam plazmidů

Název	Použití
pX458-GFP „4“	CRISPR/Cas-9 KO/KD RACK1
pX458-GFP „6“	CRISPR/Cas-9 KO/KD RACK1
pX458-mCherry	CRISPR/Cas-9 KO/KD RACK1 (RACK1-GFP linie)
hRACK1-GFP WT	Rescue / zastoupení endogenního RACK1
hRACK1-GFP S278A	RACK1 a SGs

#### 4.1.3. Seznam deoxyoligonukleotidů

Název	Sekvence	T <sub>m</sub>
gRNA 4	caccTACACCGTACAGGTAAGTGA (fwd)	-
	aaacTCAGTTACCTGTACGGTGTA (rev)	-
gRNA 6	caccACCGTGACCGTCTCTCCGGA (fwd)	-
	aaacTCCGGAGAGACGGTCACGGT (rev)	-
caRACK1 - 4F apf: (ověření CRISPR/Cas-9)	GCAGATTTGTAGGACATACCAA	58,4 °C
caRACK1 – 4R apf: (ověření CRISPR/Cas-9)	GTGTTTACAACCCTAGAACC	58,4 °C
caRACK1 - 6F apf: (ověření CRISPR/Cas-9)	GGTTCAGAGCCAGATTCTTC	58,4 °C
caRACK1 – 6R apf: (ověření CRISPR/Cas-9)	CCAGCTTTACTGAAAACAATCTTT	58,4 °C
RACK1 S278A fwd: (mutageneze RACK1)	GTACCgcCAGCAAGGCAGAAC	65,2 °C
RACK1 S278A rev: (mutageneze RACK1)	CTTGCTGgcGGTACTGATAACTTC	65,2 °C
mCherry mut. fwd: (mutageneze mCherry)	GAAGaaAacCATGGGCTGG	57,3 °C
mCherry mut. rev: (mutageneze mCherry)	GCCCATGgtTtcTTCTGC	57,3 °C
mCherry fwd EcoRI: (amplifikace mut. mCherry)	GCTgaattcaGGGATCCACCGGTCGCCACC	68,7 °C/ 75,2 °C
mCherry rev EcoRI: (amplifikace mut. mCherry)	GCTgaattcTACTTGTACAGCTCGTCCA	58,4 °C/ 70,4 °C

T<sub>m</sub> (melting temperature) - teplota denaturace primerů; teploty určeny pomocí programu Serial Cloner verze 2.6 (SerialBasics, freeware)

#### 4.1.4. Seznam enzymů

Název	Typ enzymu	Výrobce
BpII	Restrikční endonukleáza	Thermo Scientific
EcoRI	Restrikční endonukleáza	New England Biolabs
HindIII	Restrikční endonukleáza	New England Biolabs
T4	Ligáza	Thermo Scientific
Pfu-X	Polymeráza	Jena Bioscience
RedTaq	Polymeráza	Sigma-Aldrich/Merck

#### 4.1.5. Seznam primárních protilátek

Protilátka	Výrobce	Původ	Ředění WB	Ředění IF
RACK1	Santa Cruz	Myš	1:1000	1:50
GFP	Exbio	Králík	1:1000	-
RSK	Santa Cruz	Myš	1:1000	-
eIF2 $\alpha$ -P	Santa Cruz	Králík	1:1000	-
eIF4EBP1-P	Santa Cruz	Králík	1:1000	-
G3BP1	Santa Cruz	Myš	1:1000	1:50
O-GlcNAc	Santa Cruz	Myš	1:500	-

WB = Western Blot IF = Imunofluorescence

#### 4.1.6. Seznam sekundárních protilátek

Protilátka	Výrobce	Původ	Ředění
Sek. protilátka proti myší protilátce konj. s HRP	Sigma-Aldrich/Merck	Koza	1:10000
Sek. protilátka proti králíčí protilátce konj. s HRP	Sigma-Aldrich/Merck	Koza	1:5000
Sek. protilátka proti myší protilátce Alexa Fluor 568	Invitrogen	Koza	1:1000

## **4.2. Metody**

### **4.2.1. Kultivace buněk**

MDCK buňky byly kultivovány v DMEM médiu (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Sigma-Aldrich/Merck) obohaceném o 10% FBS (fetal bovine serum; Gibco). Plastové Petriho misky s kulturami byly drženy v termostatu při stálé teplotě 37°C a atmosféře obsahující 5% CO<sub>2</sub>. Po dosažení 80-90% konfluency byly buňky pasážovány, obvykle jednou za 2-3 dny. Pasáž probíhala odsátím média, opláchnutím vyhřátým PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7,3) a inkubací s PBS. Po 7-10 minutách došlo k rozvolnění mezibuněčných spojů a zakulacení buněk. Poté bylo odsáto PBS a přidán trypsin (0,05% trypsin v PBS + EDTA). Během trypsinizace v termostatu po dobu obvykle 7-10 minut došlo k odloučení buněk od podkladu. Následovalo přidání vyhřátého čerstvého média, naředění buněk na požadovanou koncentraci a jejich vysetí na nové misky.

### **4.2.2. Kryokonzervace a rozmrazování buněk**

K buňkám určeným pro kryokonzervaci bylo po trypsinizaci přidáno medium, po centrifugaci (3 min, 200 g) byly buňky rozpuštěny v čistém mediu a přeneseny do kryozkumavek. K buňkám bylo přidáno sérum (finální koncentrace 20 %) a DMSO (100mM). Kryozkumavky s buňkami byly uchovány v -80°C (příp. v tekutém dusíku).

Pro rozmrazení byly buňky rozpuštěny v mediu, po centrifugaci bylo k buňkám přidáno vyhřáté čerstvé medium a jednotlivé linie byly vysety na nové misky.

### **4.2.3. Mikroskopie živých buněk**

K ověření přítomnosti signálu u fluorescenčně značených buněčných linií sloužil invertovaný mikroskop Olympus IX51.

K detailnějšímu pozorování živých buněk byl používán mikroskop Olympus Cell-R (invertovaný mikroskop Olympus IX71) umožňující využití fázového kontrastu, time-lapse mikroskopii i pozorování fluorescenčně značených buněčných struktur.

### **4.2.4. Imunofluorescenční mikroskopie**

Pro přípravu preparátů na imunofluorescenční mikroskopii bylo potřeba nejprve pokrýt krycí sklička vrstvou fibronectinu (fibronectin v PBS, 1μg/1ml) a inkubovat 1 hodinu



při 37°C. Na těchto sklíčkách ve 12ti jamkové destičce byly poté kultivovány buňky. Pro pozorování stresových granulí byly linie nejprve stresovány (viz níže). Dále byly buňky fixovány 15 minut v PFA (4% paraformaldehyd v 100mM KPO<sub>4</sub>, pH 6,5), permeabilizovány 10 minut Tritonem (1% Triton-X100 v 100mM KPO<sub>4</sub>, pH 6,5) a 3x opláchnuty v roztoku BSA (1% bovine serum albumin v 100mM KPO<sub>4</sub>, pH 6,5). Sklíčka s buňkami byla poté 1 hodinu blokována v 1% BSA v 100mM KPO<sub>4</sub> a následně ve tmě inkubována 3 hodiny s primární protilátkou (rozpuštěna v 1% BSA v 100mM KPO<sub>4</sub>, pH 6,5). Po opláchnutí nena vázané primární protilátky 1% BSA v 100mM KPO<sub>4</sub> následovala inkubace ve tmě se sekundární protilátkou (rozpuštěna v 1% BSA v 100mM KPO<sub>4</sub>). Poté byla sklíčka opláchnuta, nejprve 1% BSA v 100mM KPO<sub>4</sub>, poté 100mM KPO<sub>4</sub> a nakonec destilovanou vodou. Po opláchnutí byla krycí sklíčka s buňkami připevněna na podložní sklíčko s montovacím médiem (Vectashield s DAPI; Vector Laboratories) a zataveno lakem proti vyschnutí. Snímky byly pořízeny na mikroskopu Olympus BX43.

#### **4.2.5. Stresování buněk**

Pro možnost pozorování stresových granulí pomocí imunofluorescenční mikroskopie byly buňky před zafixováním v PFA stresovány. Používali jsme dva typy stresu, oxidativní stres vyvolaný působením arzenu a teplotní stres. V prvním případě byl použit arzen (AsNaO<sub>2</sub> - sodium arsenite, 0,5mM) po dobu 30 minut. Teplotní stres probíhal v termobloku (Eppendorf Thermomixer C) při 44 °C po dobu 25 minut.

#### **4.2.6. Příprava lyzátů a SDS PAGE**

Buňky určené pro přípravu lyzátů byly nejprve opláchnuty vychlazeným roztokem PBS a poté lyzovány v rovněž vychlazeném RIPA pufru (50mM Tris-HCl o pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoxycholát sodný, 0,1% SDS, 1mM EDTA, pH=7.3). Pro lyzi buněk na nejčastěji používané Petriho misce o průměru 6 cm bylo použito 250 µl RIPA pufru. Po seškrabání zbytků buněk stěrkou byly lyzáty přeneseny do mikrozkušavek držných na ledu. Následovala centrifugace vzorků v chlazené centrifuze po dobu 15 minut při 14 000 g. Pelet byl odstraněn a pomocí kitu (Pierce BCA Protein Assay Kit, postupováno dle návodu výrobce) byla změřena koncentrace proteinů ve vzorcích. Podle změřené koncentrace bylo ke vzorkům přidáno odpovídající množství Laemmli vzorkového pufru (50mM Tris-HCl

pH 6,8, 2% SDS, 10% glycerol, 1%  $\beta$ -merkatpoethanol, 12,5mM EDTA, 0,02% bromfenolová modř, vše Sigma-Aldrich) v poměru 4:1 (lyzáť:pufr), dále 100mM DTT (dithiothreitol; v poměru 0,6  $\mu$ l DTT na 10  $\mu$ l vzorku) a vzorky byly povařeny po dobu 3 minut při 100°C.

Proteiny z jednotlivých lyzáťů byly rozděleny podle molekulové hmotnosti na 10% nebo 12% akrylamidovém gelu (složení separačního a zaostřovacího gelu je uvedeno v tabulce níže) v elektroforetickém pufru (25mM Tris-Hcl, 192mM glycin, 0,1% SDS). Aplikován byl konstantní proud 15 mA na jeden zaostřovací gel o tloušťce 0,75 mm a 30 mA na jeden separační gel o stejné tloušťce.

#### Složení zaostřovacího a separačního gelu pro SDS-PAGE:

Zaostřovací gel 4% (5 ml):		Separační gel 10% (15 ml):	
29% Akrylamid, 1% Bisakrylamid	650 $\mu$ l	29% Akrylamid, 1% Bisakrylamid	5 ml
0.5M Tris pH 6.8	1,25 ml	1.5M Tris pH 8.8	3,75 ml
10% SDS	50 $\mu$ l	10% SDS	150 $\mu$ l
10% APS	35 $\mu$ l	10% APS	50 $\mu$ l
TEMED	7 $\mu$ l	TEMED	10 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	3,1 ml	H <sub>2</sub> O	6,75 ml

Všechny reagenty byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich/Merck.

#### 4.2.7. Western Blot

Proteiny rozdělené podle molekulové hmotnosti metodou SDS-PAGE byly dále přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (Sigma-Aldrich/Merck; velikost póru 0,45  $\mu$ m) v transferovém pufru (48mM Tris-HCl, 39mM Glycin, 0,0375% SDS, 20% methanol, vše Sigma-Aldrich/Merck). Aplikováno bylo konstantní napětí 100-110 V po dobu 1,5 hodiny. Po přenosu byly membrány zablokovány v 3% roztoku odtučněného mléka (Santa Cruz, 3% mléko v PBS, 0,05% Tween-20) po dobu 1 hodiny. Po vyjmutí z blokovacího roztoku byly membrány opláchnuty v PBS-T (PBS, 0,05% Tween-20) a zataveny do PE folie s roztokem příslušné primární protilátky v 5% BSA v PBS-T. Inkubace probíhala po dobu 3 hodin při pokojové teplotě nebo přes noc při 4 °C. Následně byly membrány opláchnuty v PBS-T (3x10 min) a inkubovány 1 hodinu s roztokem odpovídající sekundární protilátky konju-

gované s HRP (rozpuštěné v blokovacím roztoku). Poté byla přebytná sekundární protilátka opláchnuta roztokem PBS-T (3x10 min). Detekce signálu byla provedena na autoradiografické filmy za využití luminogenních substrátů (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce). Vyvolání filmů probíhalo v temné komoře na přístroji Agfa Curix 60.

V případě potřeby opakované detekce proteinů byly protilátky navázané na membráně odstraněny inkubací s 0,2M NaOH po dobu 15 min. Po promytí destilovanou vodou následovalo zablokování membrán v 3% roztoku mléka a inkubace s novou primární protilátkou.

#### **4.2.8. Imunoprecipitace**

Buňky určené pro imunoprecipitaci byly po opláchnutí chlazeným PBS lyzovány ve FLAG pufru (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 0,5mM EDTA, 0,5mM EGTA o pH 7,3). Poté byl lyzát centrifugován (9400g, 15min při 4°C) a odebraný supernatant byl inkubován s příslušnou protilátkou navázanou na agarózových kuličkách (Sigma-Aldrich/Merck) při 4 °C po dobu 1,5 hodiny. Následně byly nenavázané proteiny odstraněny od agarózových kuliček opakovaným oplachem ve FLAG-pufru a centrifugací. Dále byl k navázaným proteinům na protilátce přidán FLAG-pufr, Laemmliho vzorkový pufr s 5mM DTT (v poměru 4:1). Připravený precipitát byl povařen při 100 °C po dobu 10 minut, centrifugován a pelet byl odstraněn.

#### **4.2.9. Polyzomové profily**

Pro metodu polyzomových profilů bylo třeba připravit si den předem sacharózové gradienty z 5% a 45% roztoku sacharózy. Sacharóza pro gradienty byla rozpuštěna v pufru B (10 mM HEPES o pH 7,5, 62,5 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT). Buňky byly nejprve 1 minutu inkubovány s cykloheximidem (100 µg/1 ml) a následně lyzovány v pufru A (10 mM HEPES o pH 7,5, 62,5 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, mini Complete EDTA-free inhibitory proteáz, 1% Triton X-100). Vzorky byly poté naředěny na stejnou koncentraci a naneseny na sacharózové gradienty. Po 2,5h ultracentrifugaci při 39 000 otáček/min (rotor SW41) a 4 °C byly vzorky analyzovány pomocí spektrofotometru (260 nm).

#### 4.2.10. Polymerázová řetězová reakce (PCR), restrikce a ligace DNA

K amplifikaci nebo mutagenезi vybraných úseků DNA byl použit přístroj Biometra Tadvanced, Analytic Jena. Polymerázové reakce probíhaly v objemu 15-20  $\mu$ l (2 x 0,4 $\mu$ M DNA primer, Pfu nebo RedTaq pufr s MgSO<sub>4</sub> [Fermentas], 200 $\mu$ M dNTP [deoxynukleotidtrifosfát; Fermentas], 10-100 ng templátové DNA, 0,5U Pfu-X nebo RedTaq DNA polymerázy, doplněno destilovanou vodou). Pfu-X polymeráza byla používána k mutagenезi a k amplifikaci úseku chromozomální DNA, RedTaq byla používána k ověření přítomnosti úseku na plazmidu. Použité cykly jsou v tabulce níže.

Příprava gRNA probíhala na principu denaturace a následné renaturace navržených úseků DNA (viz 4.1.3), dle následující reakce (50  $\mu$ l): 2 x 4 $\mu$ M oligonukleotidu, 5 $\mu$ l reakční pufr (NEB 2.1), doplněno destilovanou vodou. Použitý program je v tabulce níže.

Restrikce DNA probíhala 2 hodiny při 37 °C podle doporučení výrobce restriktáz. K ligaci DNA byla použita T4 DNA ligáza a postupováno bylo dle návodu výrobce. Ligace probíhala 2 hodiny při pokojové teplotě nebo přes noc při 16 °C.

<b>PCR program: mutagenезe</b>			
<b>Č. kroku</b>	<b>Teplota</b>	<b>Čas</b>	<b>Poznámka</b>
1.	95 °C	2 min	Závisí na použité polymeráze (Pfu-X)
2. (10 cyklů)	95 °C	20 s	Závisí na použité polymeráze
	Max 68 °C	30 s	Teplota nasedání primerů: viz 4.1.3
	68 °C	?	Závisí na použité polymeráze a délce výsledného produktu (1kb/1min)
3. (20 cyklů)	95 °C	20 s	Závisí na použité polymeráze
	Max 68 °C	30 s	Teplota nasedání primerů: viz 4.1.3
	68 °C	?	Závisí na použité polymeráze a délce výsledného produktu (1kb/1min)
4.	68 °C	10 min	Dokončení syntézy

<b>PCR program: amplifikace</b>			
<b>Č. kroku</b>	<b>Teplota</b>	<b>Čas</b>	<b>Poznámka</b>
1.	94/95 °C	½ min	RedTaq/Pfu-X
2. (30 cyklů)	94/95 °C	30 s	RedTaq/Pfu-X
	?	1 min	Teplota nasedání primerů: viz 4.1.3
	72/68 °C	?	RedTaq/Pfu-X, 1kb/1min
3.	68 °C	10 min	Dokončení syntézy
<b>Příprava gRNA</b>			
1.	95 °C	5 min	Denaturace
2.	95 °C → 25 °C	70 min	Renaturace: -1 °C/1 min

#### 4.2.11. Agarózová elektroforéza, extrakce DNA z gelu

Pro rozdělení DNA fragmentů podle velikosti byl použit 0,5-2% agarózový gel (viz tab. níže). Gel je složen z práškové agarózy (SERVA) rozpuštěné v Tris-acetátovém pufru (TAE; 40mM Tris, 20mM kys. octová, 1mM EDTA) a ethidiumbromidu (0,05 µg/ml). Vodný roztok DNA byl smíchán s nanášecím pufrem (Thermoscientific; 0,06 % bromfenolová modř, 60 % glycerol, 60 mM EDTA) v poměru 1:6 (pufr:objem DNA). Elektroforéza probíhala v TAE pufru při konstantním napětí 90 V.

Extrakce námi požadovaného DNA fragmentu probíhala pomocí „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) dle návodu výrobce. DNA byla na závěr eluována destilovanou vodou nebo elučním pufrem z kitu.

#### Koncentrace agaru v TAE určená velikostí rozdělovaných DNA fragmentů:

<b>Konc. agaru v TAE</b>	<b>Velikost DNA (bp)</b>
0,5%	1000 - 30 000
0,7%	800 - 12 000
1,0%	500 - 10 000
1,2%	400 - 7 000
1,5%	200 - 3 000
2,0%	50 - 2 000

#### **4.2.12. Konstrukce plazmidového vektoru, replikace plazmidu v bakteriích, izolace plazmidů**

Pro zacílení sekvence RACK1 genu v MDCK WT liniích pomocí CRISPR/Cas-9 metody byl použit vektor PX458 obsahující sekvenci pro Cas-9, GFP a ampicilinovou rezistenci. Vektor byl štěpen pomocí BpiI a ligován s odpovídajícími sekvencemi pro gRNA pomocí T4 ligázy.

Za účelem heterologní exprese lidské varianty RACK1 v MDCK buňkách byl použit vektor pEGFP-N1-hRACK1-GFP WT (poskytla dr. Nancy Kedersha, Brigham and Women's Hospital, Boston, USA).

Pro delecí endogenního RACK1 v liniích exprimujících rovněž hRACK1-GFP byl zkonstruován nový vektor. Aby byla možná selekce těchto klonů, bylo potřeba vložit do připraveného PX458 vektoru sekvenci pro mCherry místo GFP. Tuto sekvenci bylo třeba před vložením do vektoru mutovat pomocí PCR (viz dále).

Připravenou plazmidovou DNA byly transformovány kompetentních buňky *E. coli* metodou tepelného šoku (42 °C, 2 min). Kultivace bakterií a následná izolace plazmidové DNA byla provedena dle protokolu „QIAprep Miniprep Kit“ nebo „QIAprep Midiprep Kit“ od firmy Qiagen. Ve finálním kroku izolace byla DNA eluována destilovanou vodou nebo elučním pufrem z kitu.

#### **4.2.13. Transfekce vektorů do buněk**

DNA vektory byly do MDCK buněk vneseny za užití reagentie Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Postupováno bylo dle pokynů výrobce. Po 6 hodinách od transfekce bylo médium s transfekční směsí odsáto a k buňkám bylo přidáno čerstvé médium. Vektory určené pro přípravu stabilních linií obsahují sekvenci pro rezistenci proti geneticinu, který byl přidán k buňkám za účelem selekce těch buněk, u kterých transfekce proběhla úspěšně. Následovala selekce pomocí metody FACS.

#### **4.2.14. Sekvenování**

Pro určení přesné sekvence určitého úseku DNA jsme v našich experimentech využívali metody Sangerova sekvenování. Sekvenační reakce byly provedeny firmou SeqMe (<https://www.seqme.eu/>).

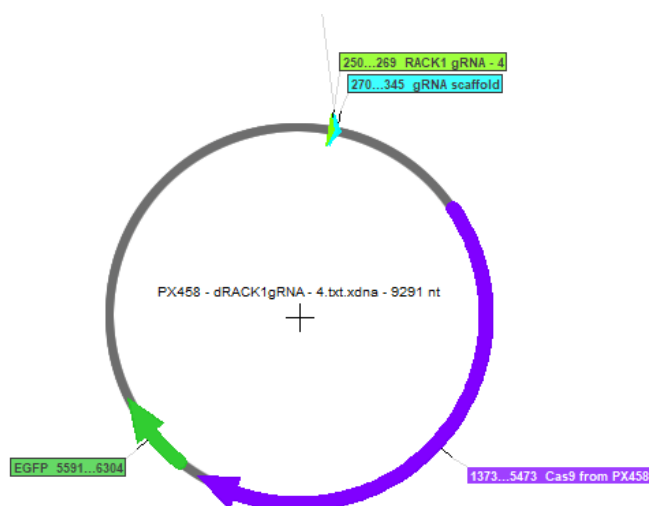
## 5. Výsledky

### 5.1. Příprava a analýza MDCK buněčných linií vykazujících sníženou expresi RACK1 (RACK1 KD)

Protein RACK1 se v buňce účastní mnoha signálních drah a díky tomu se podílí na regulaci řady klíčových buněčných procesů. V raném embryonálním vývoji eukaryot je jeho delece letální (více rozepsáno v diskuzi, viz kap. 7). Abychom blíže porozuměli funkci RACK1, zaměřili jsme se nejprve na přípravu MDCK buněčných linií exprimujících nižší množství tohoto proteinu (dále označovaných také jako RACK1 KD). U těchto linií jsme následně charakterizovali změny fenotypu způsobené RACK1 deplecí.

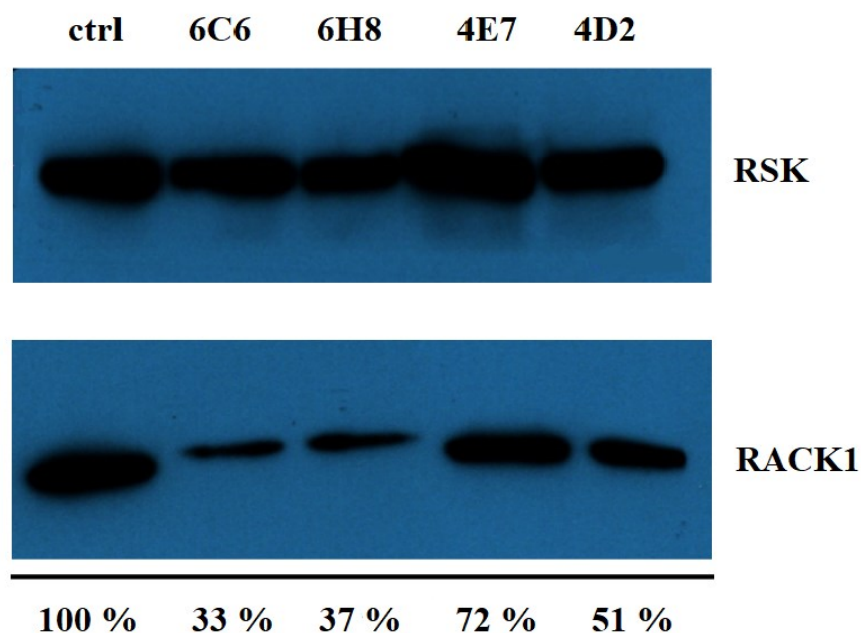
#### 5.1.1. Příprava buněčné linie s deplecí RACK1 s využitím metody CRISPR/Cas-9

Zisku RACK1 KD linie jsme dosáhli pomocí metody CRISPR/Cas-9 za využití PX458 vektoru (viz obr. 8). Pro zacílení RACK1 genu byly použity tyto dva vektory obsahující odlišné „guide-RNA“ (gRNA). gRNA „4“ byla cílena do sekvence na rozhraní 3. exonu a intronu a gRNA „6“ do oblasti 5. exonu. K navržení gRNA byla použita webová aplikace CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>).



Obrázek 8: Vektor PX458 použitý pro metodu CRISPR/Cas-9.

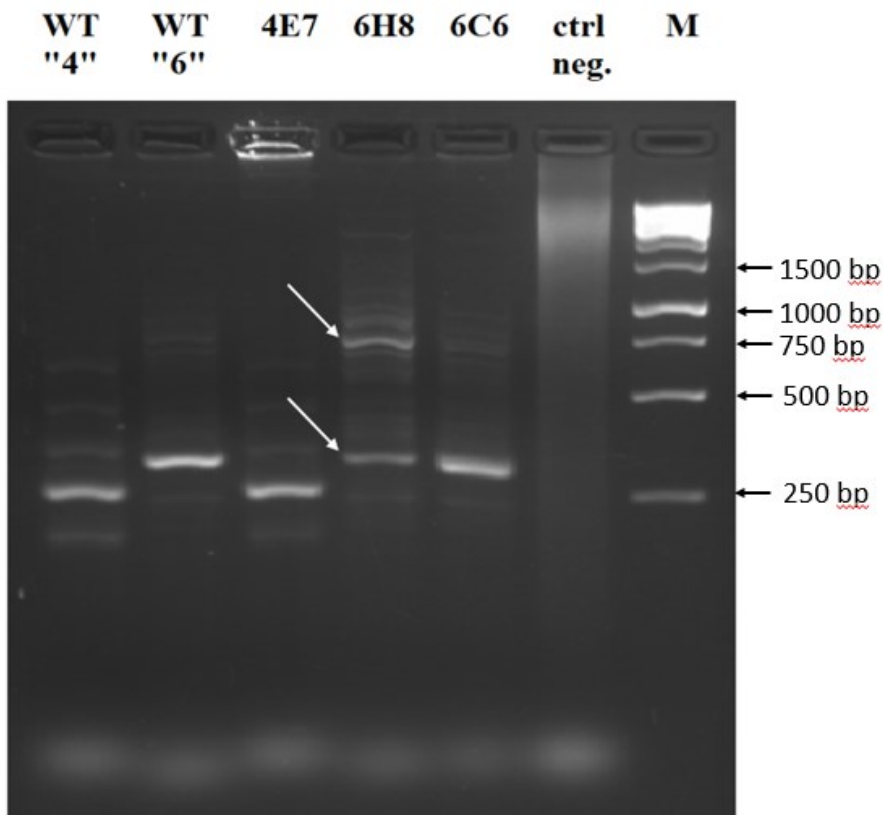
Po dvou nezávislých kolech CRISPR/Cas9 a analýze celkem 59 klonů pomocí metody Western Blot jsme získali několik linií s výrazně nižší expresí RACK1 ve srovnání s WT linií (viz obr. 9). Nepodařilo se však vygenerovat žádnou linii s nulovou expresí RACK1.



**Obrázek 9: Ověření hladiny exprese RACK1 v buněčných liniích, u kterých byla provedena metoda CRISPR/Cas-9.** Byly použity protilátky proti RACK1 a RSK (sloužící jako kontrola nanášky). Pořadí zleva: kontrolní buněčná linie s normální úrovní exprese RACK1; analyzované linie s různě sníženou úrovní exprese RACK1 oproti kontrolní linii. Hodnoty vyjadřují procentuální snížení hladiny exprese RACK1 oproti kontrolní linii, normalizované kontrolou nanášky. Linie „6C6“ a „6H8“ byly transfekovány vektorem obsahujícím gRNA „6“, linie „4E7“ a „4D2“ vektorem obsahujícím gRNA „4“. Doba expozice: 5 s.

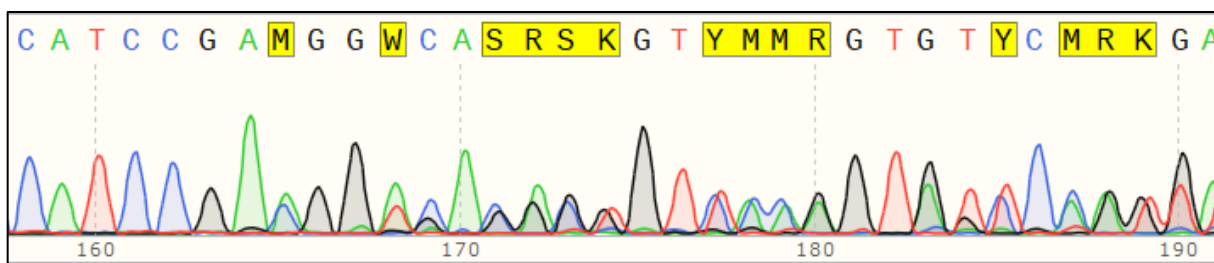
Pro sledování změn v oblasti genu pro RACK1 jsme následně vybrané buněčné linie analyzovali pomocí metody PCR. Amplifikovány byly genomické úseky odpovídající oblastem zacíleným pomocí obou použitých gRNA. V případě linie „6H8“ jsme pozorovali dva produkty o různé velikosti (viz obr. 10).



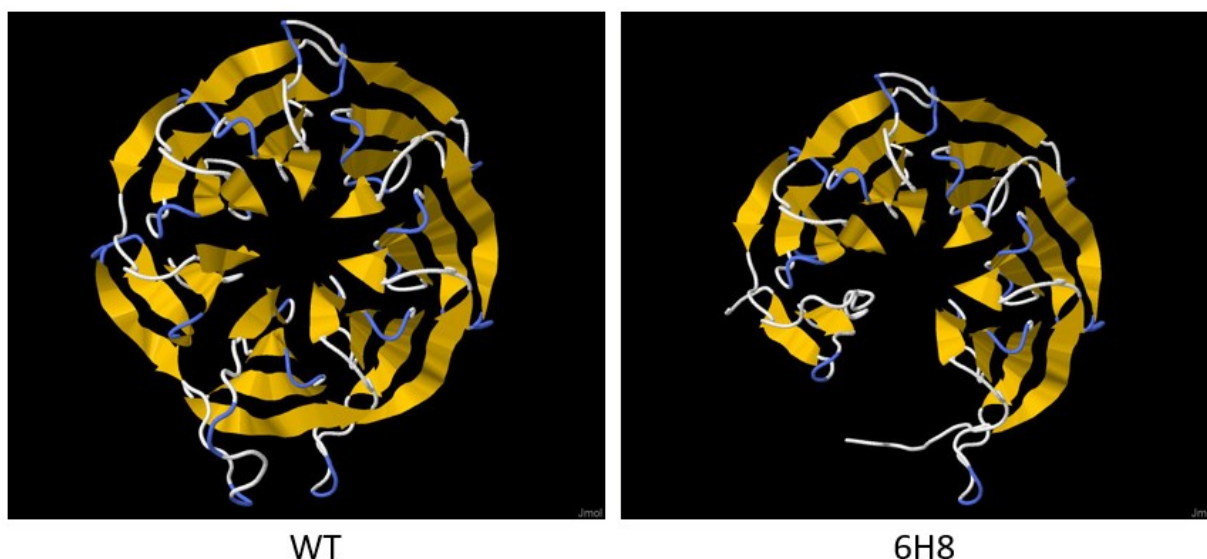


**Obrázek 10: PCR produkty rozdělené v agarózovém gelu.** Zleva WT „4“ a WT „6“, kde byly amplifikovány úseky odpovídající oblasti rozpoznané gRNA „4“ a „6“. PCR produkt linie „4E7“ odpovídá PCR produktu WT „4“. U linie „6H8“ jsou rozlišitelné dva produkty o různé velikosti (vyznačeny šipkami) – jeden produkt odpovídá úseku rozpoznanému gRNA „6“ a druhý má velikost cca 750bp, což naznačuje mutaci na jedné RACK1 alele vzniklou působením Cas-9. Linie „6C6“ zde odpovídá WT „6“. Následuje PCR negativní kontrola a marker (GeneRuler [ThermoScientific; SM0311] 1kbp)

Stejný výsledek z PCR se však již nepodařilo zopakovat. U linie „6H8“ jsme proto následně pomocí PCR amplifikovali oblast RACK1 genu zacílenou pomocí CRISPR/Cas-9 a odeslali k sekvenování. Výsledky Sangerova sekvenování potvrdily mutaci na jedné alele RACK1 (viz obr. 11). Na základě sekvence mutované RACK1 alely získané ze sekvenování jsme pomocí programu Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) predikovali strukturu proteinu vznikajícího podle této mutované sekvence (viz obr.12).



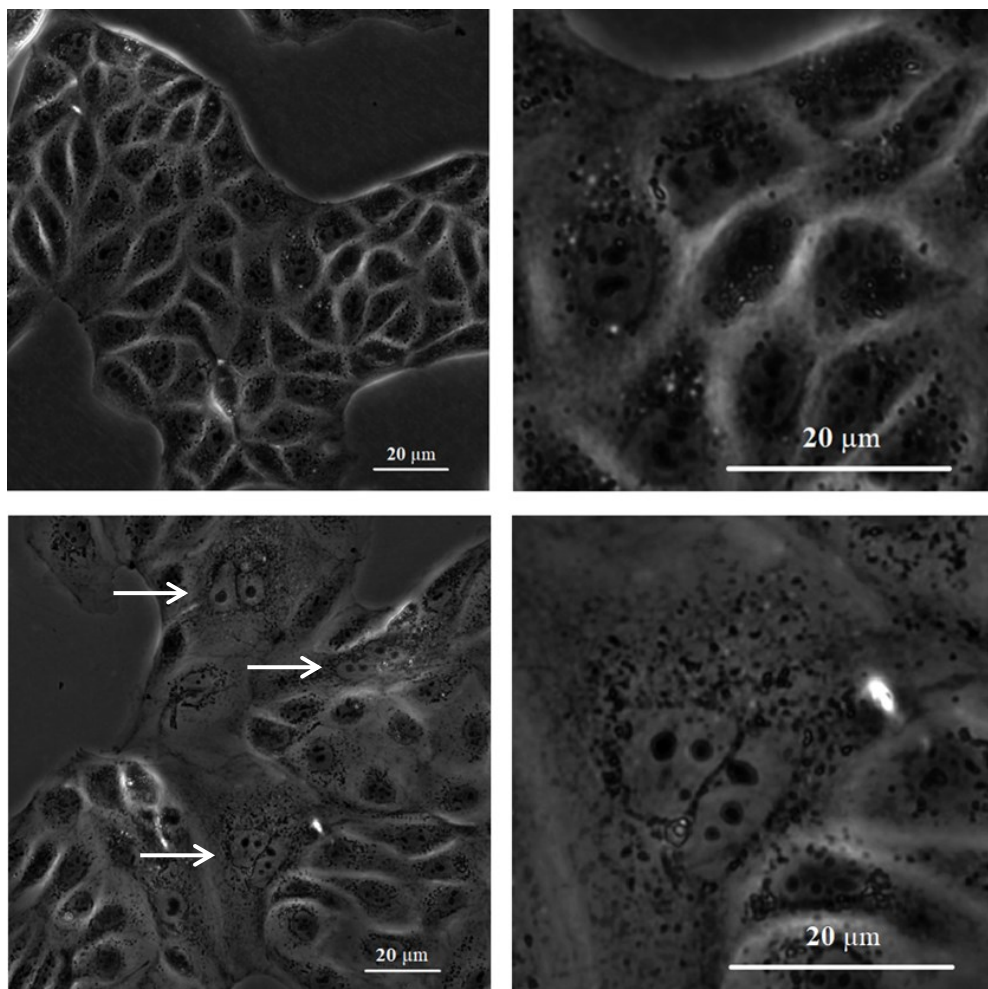
**Obrázek 11: Ukázka výsledku Sangerova sekvenování.** Byl sekvenován úsek RACK1 genu, zacílený CRISPR/Cas-9 (gRNA „6“). Sekvence zobrazuje dva odlišné produkty začínající na sekvenačních koordinátech 164, což potvrzuje mutaci na jedné RACK1 alele. Při porovnání původní sekvence RACK1 genu s výsledky sekvenování jsme získali sekvenční na mutované alele. Následně jsme potvrdili posun čtecího rámce v této sekvenční způsobený inzercí 8 nukleotidů v oblasti štěpené Cas-9.



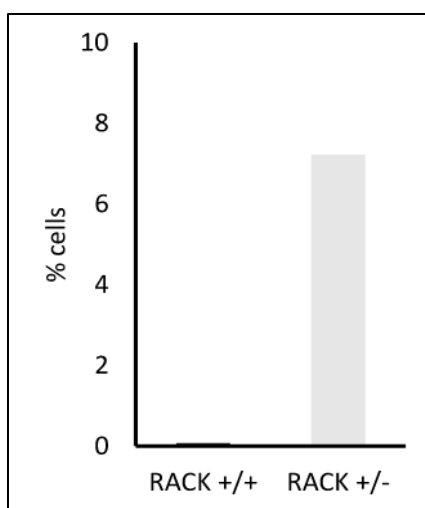
**Obrázek 12: Porovnání struktury proteinu RACK1 ve WT linii (vlevo) a predikované struktury proteinu vznikajícího podle mutované sekvence v linii „6H8“ (vpravo).** Mutace v genu pro RACK1 způsobila posun čtecího rámce a vznik předčasněho terminačního kodonu. Případný protein vznikající podle této mutované genové sekvence by měl výrazně zkrácenou aminokyselinovou sekvenci. Obrázky vytvořeny s pomocí programu Jmol (<http://jmol.sourceforge.net/>).

### 5.1.2. Studium morfologie RACK1 KD linie

Morfologii linie „6H8“, exprimující snížené množství RACK1, jsme poté studovali pomocí live cell imaging. Pozorovali jsme velké množství dvoujaderných i vícejaderných buněk a buňky s výrazně větší velikostí ve srovnání s WT linií (viz obr. 13 a 14). Buňky s deplecí RACK1 se také vyznačovaly pomalejším růstem oproti buňkám WT linie.



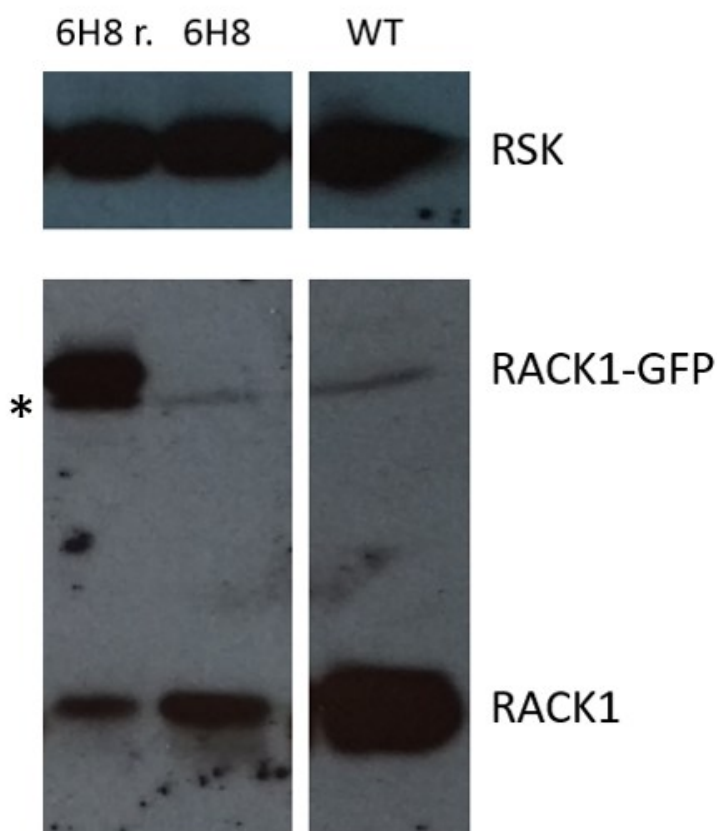
**Obrázek 13:** Fotografie WT linie a buněčné linie „6H8“ exprimující snížené množství RACK1, pořízené pomocí fázového kontrastu. Nahoře WT linie, dole linie „6H8“, kde jsou patrné vícejaderné buňky (označeny šipkami) lišící se dále od WT buněk velikostí a pomalejším růstem.



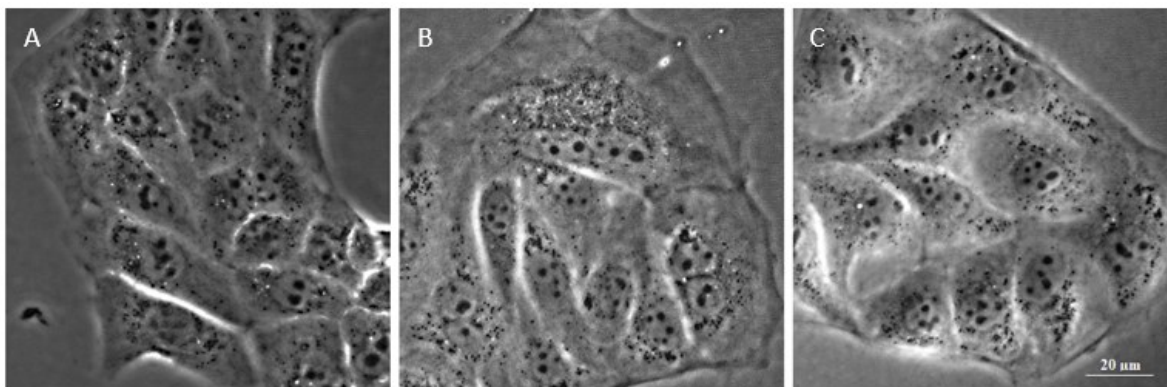
**Obrázek 14:** Procentuální podíl vícejaderných buněk v linii „6H8“ (RACK +/-) ve srovnání s WT linií (RACK +/+). Snížená exprese RACK1 způsobuje zvýšený výskyt dvoujaderných, výjimečně i vícejaderných buněk.

### 5.1.3. „Rescue“ RACK1 KD linie

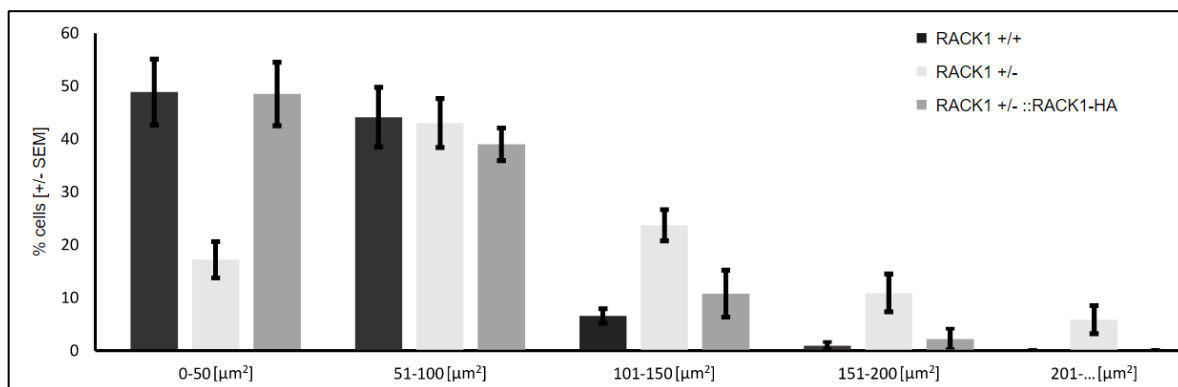
Pro ověření specificity použitého CRISPR/Cas-9 vektoru jsme zvolili „rescue“ experiment. Nejprve jsme provedli transfekci „6H8“ linie vektorem obsahujícím hRACK1-GFP (lidskou variantu RACK1 fúзованou s GFP). Po selekci transfekovaných buněk pomocí antibiotika geneticinu a metody FACS jsme pomocí metody Western Blot ověřili úroveň exprese RACK1 a RACK1-GFP a potvrdili tím úspěšnost transfekce (viz obr. 15). Následně jsme u těchto buněk pozorovali návrat k původnímu (WT) fenotypu (viz obr. 16 a 17). Tím jsme potvrdili, že odlišná morfologie buněk linie „6H8“ byla způsobena RACK1 deplecí.



**Obrázek 15: Ověření exprese RACK1 a RACK1-GFP v buněčných liniích po „rescue“ experimentu.** Byly použity protilátky proti RACK1 a RSK, sloužící jako kontrola nanášky. Zleva linie „6H8“ po „rescue“, tedy po transfekci vektorem obsahujícím hRACK1-GFP. Tato linie kromě RACK1 exprimuje také RACK1-GFP. Uprostřed linie „6H8“, exprimující pouze endogenní RACK1. Zároveň obě tyto linie ve srovnání s WT linií (vpravo) podle očekávání vykazují nižší expresi endogenního RACK1. \* označuje nespecifický band. Doba expozice: 2 min.



**Obrázek 16: Porovnání morfologie WT linie (A), RACK1 KD („6H8“) linie (B) a stejné („6H8“) linie po „rescue“ experimentu (C).** Buňky exprimující snížené množství RACK1 jsou často vícejaderné a výrazně větší než WT buňky, zatímco tato linie po „rescue“ experimentu exprimující lidskou variantu RACK1 připomíná spíše WT fenotyp. Pro pozorování buněk a pořizování snímků bylo využito fázového kontrastu.

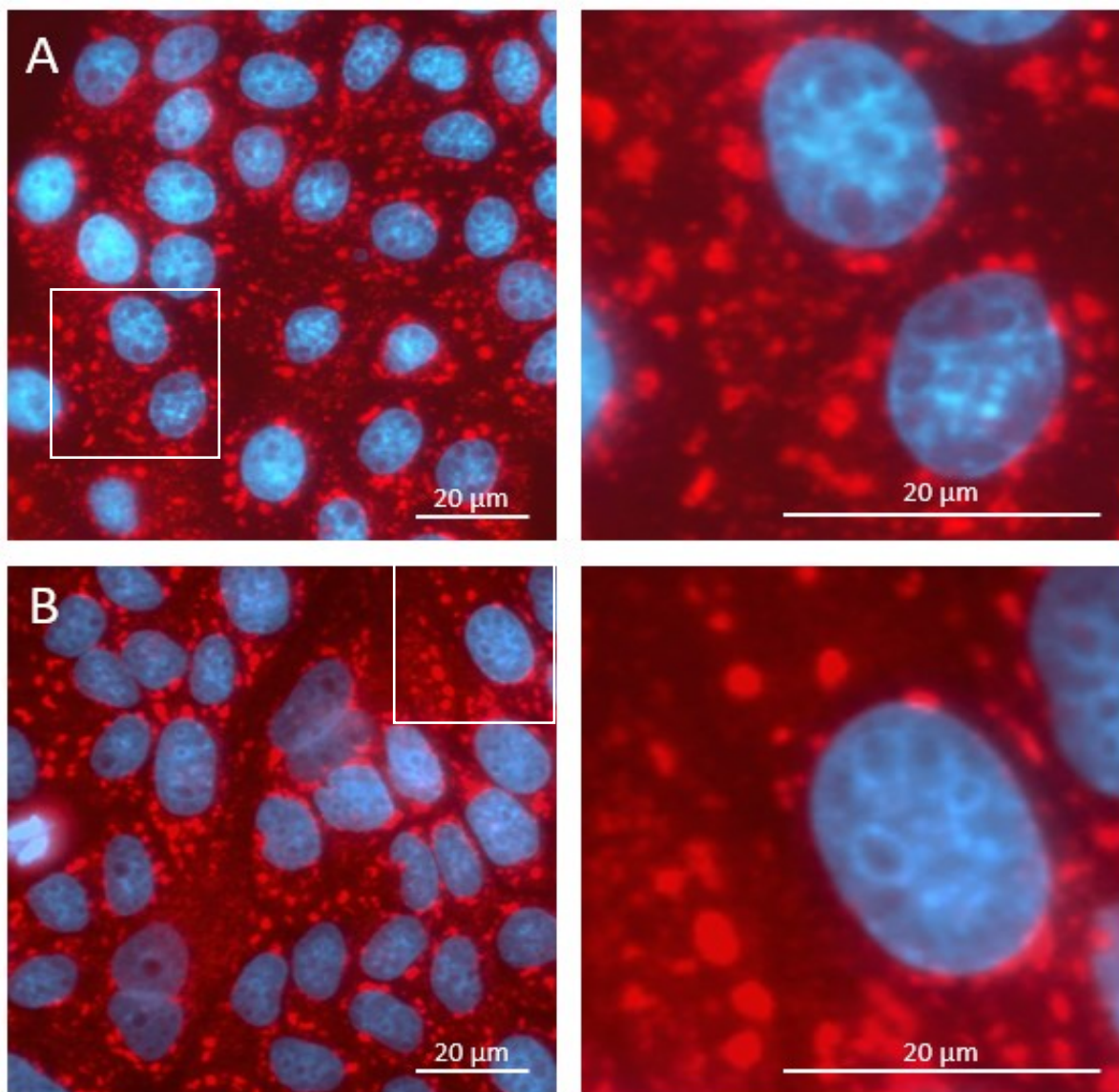


**Obrázek 17: Porovnání velikosti buněk u WT (+/+) linie, RACK1 KD (+/-) linie a RACK1 KD linie po provedeném „rescue“ experimentu** (v tomto případě byla RACK1 KD linie transfekována plazmidem nesoucím značku HA místo GFP). U RACK1 KD linie je jasný rozdíl ve velikostech buněk oproti WT, zatímco buňky exprimující RACK1-HA odpovídají velikostně WT linii. Pro pozorování buněk a pořizování snímků bylo využito kvantitativního fázového kontrastu (Experiment provedl T. Groušl).

#### 5.1.4. Tvorba stresových granulí (SG) u RACK1 KD linie

U linie s deplecí RACK1 („6H8“) jsme dále pomocí imunofluorescenční mikroskopie pozorovali tvorbu stresových granulí za oxidativního stresu vyvolaného působením arzenu. Byla použita protilátka proti proteinu G3BP1, jedné z hlavních složek SG. Nezaznamenali jsme sníženou tvorbu SG u této linie (viz obr. 18).

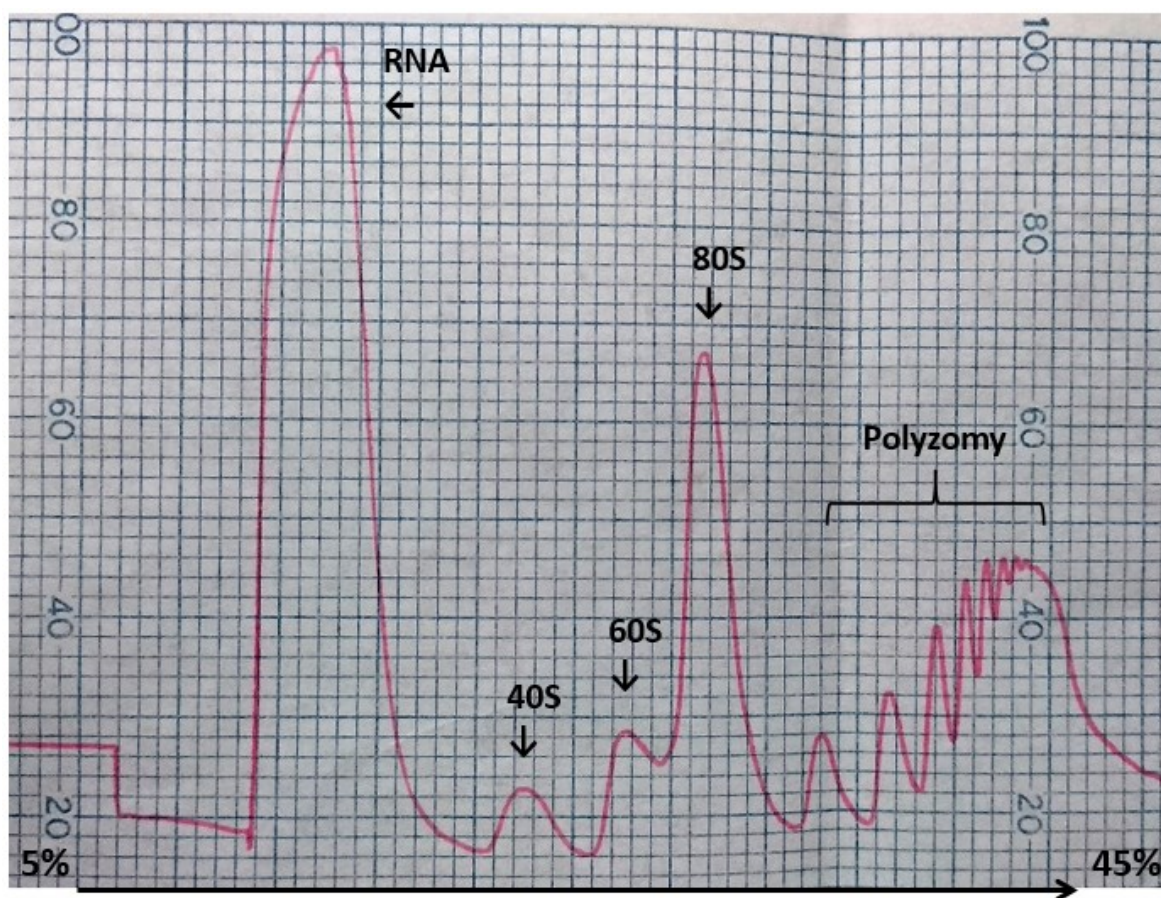




**Obrázek 18: Snímky z imunofluorescenční mikroskopie znázorňující tvorbu stresových granulí u WT linie a linie „6H8“ RACK1 KD. Byla použita protilátka proti G3BP1. Množství ani vzhled stresových granulí u WT linie (A) a RACK1 KD linie (B) se neliší. Samotný RACK1 a jeho případný úbytek v SG nebylo možné sledovat, protože protilátka proti RACK1 není vhodná pro IF. Bílé rámečky v obrázcích vlevo představují výřez vpravo.**

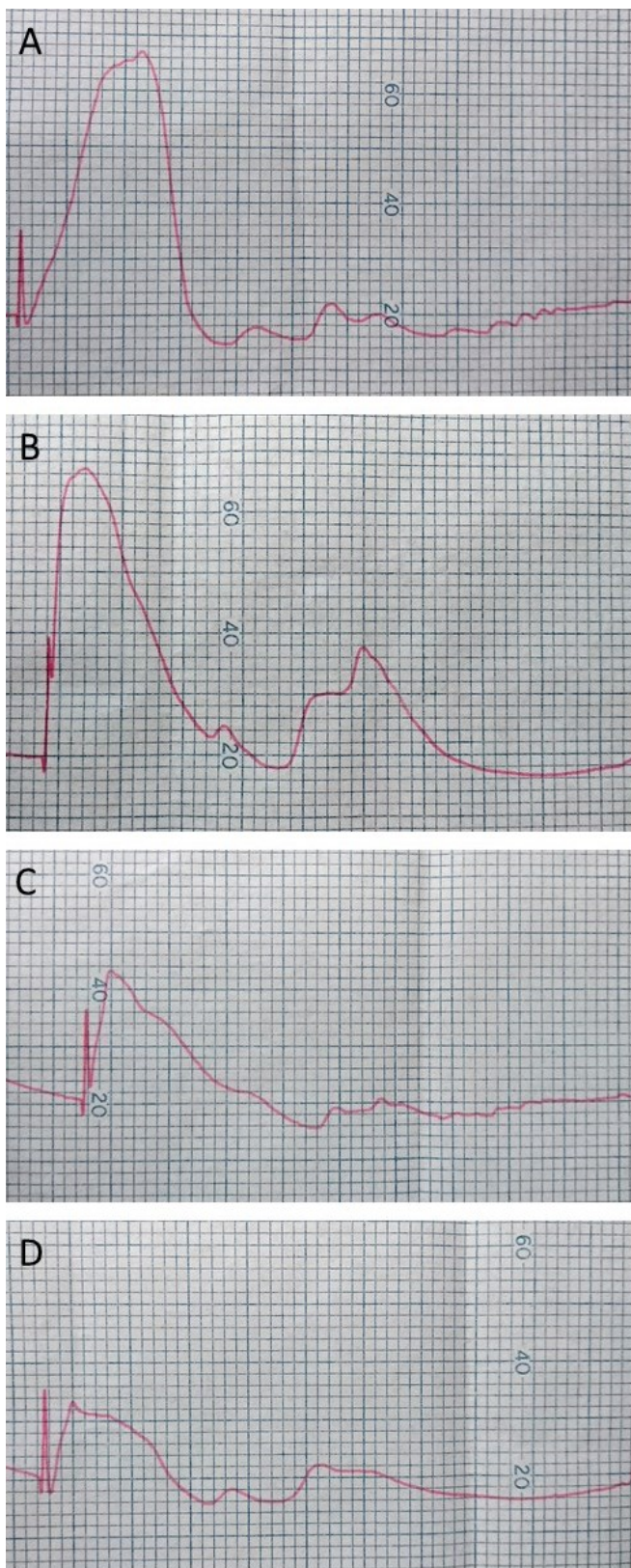
### 5.1.5. Analýza translace linie za stresu – polyzomové profily

K pozorování případných změn v translaci způsobených nižší expresí RACK1 jsme použili metodu polyzomových profilů. Sledovali jsme WT linii a „6H8“ linii, každou za kontrolních a stresových podmínek. Zaznamenali jsme však pouze vliv stresu na translaci u WT linie, v případě „6H8“ linie vzhledem k výrazné degradaci RNA zatím nemůžeme dospět k jasnému závěru (viz obr. 19 a 20).



**Obrázek 19: Vzorový výsledek translačního profilu WT linie za kontrolních podmínek.** Jednotlivé RNA frakce byly rozděleny centrifugací v kontinuálním 5-45% sacharózovém gradientu (na grafu zleva doprava). V obrázku je vyznačena volná RNA, malá (40S) a velká (60S) ribozomální podjednotka, monozom (80S) a následují polyzomy. Přítomnost polyzomů poukazuje na fyziologický průběh translace. Za stresu dochází k rozpadu polyzomů a k navýšení počtu monozomů.



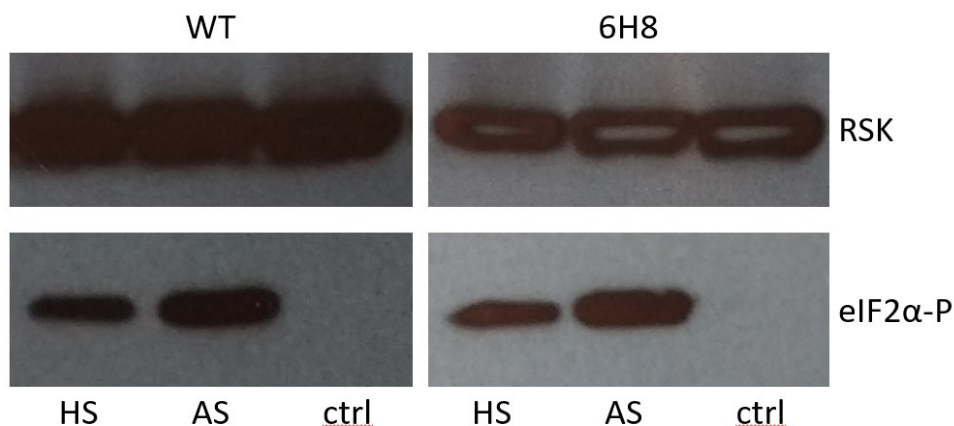


**Obrázek 20: Srovnání stavu translace ve WT linii a RACK1 KD linii („6H8“) za kontrolních a stresových podmínek (oxidativní stres vyvolaný arzenem). WT linie za kontrolních podmínek (A) vykazuje standardní množství volné RNA, obou ribozomálních podjednotek, monozomů i polyzomů, což značí fyziologický průběh translace. Oproti tomu WT linie za stresových podmínek (B) neobsahuje žádné polyzomy, ale zato velké množství monozomů a volných 60S podjednotek. Jedná se o klasický výsledek reakce na stresové podmínky, kdy dochází k rozpadu polyzomů a pozastavení iniciace translace, tedy k nárůstu počtu monozomů. U linie „6H8“ se sníženou expresí RACK1 (C) dochází z neznámých důvodů k výrazné degradaci volné RNA, ale je možné detekovat přítomnost polyzomů, na rozdíl od stejné linie za stresových podmínek (D), kde polyzomy nejsou obsaženy, ale stejně jako u WT linie došlo k nárůstu množství 60S podjednotek a nepatrně i monozomů.**



### 5.1.6. Analýza translace linie za stresu - úroveň fosforylace eIF2 $\alpha$

Za stresových podmínek dochází k fosforylaci  $\alpha$  podjednotky iniciačního faktoru eIF2, což způsobí pozastavení iniciace translace. Pomocí metody Western Blot jsme testovali, zda snížené množství RACK1 u linie „6H8“ má vliv na úroveň fosforylace eIF2 $\alpha$ . Nezaznamenali jsme žádný rozdíl v eIF2 $\alpha$  fosforylaci mezi WT linií a „6H8“ linií (viz obr. 21).



**Obrázek 21: Srovnání úrovně fosforylace eIF2 $\alpha$  ve WT linii a „6H8“ RACK1 KD linii za teplotního a oxidativního stresu a za kontrolních podmínek.** Byly použity protilátky proti fosforylované eIF2 $\alpha$  a proti RSK (kontrola nanášky). Buňky jsme vystavili teplotnímu stresu („HS“) a oxidativnímu stresu vyvolaného působením arzenu („AS“). Vlevo WT linie, vpravo RACK1 KD. Obě tyto linie vykazují fosforylaci eIF2 $\alpha$  za teplotního i oxidativního stresu, zatímco za kontrolních podmínek („ctrl“) jsme fosforylaci nezaznamenali ani u jedné z linií. Zároveň se u obou těchto linií zdá přítomna vyšší úroveň fosforylace eIF2 $\alpha$  za oxidativního stresu, ve srovnání se stresem teplotním. Doba expozice: 1 min.

### 5.1.7. Shrnutí

Použili jsme metodu CRISPR/Cas-9 pro snížení exprese RACK1 v MDCK buněčné linii. Vzhledem k nulovému zisku RACK1 homozygotních deletantů je pravděpodobné, že MDCK buňky bez tohoto proteinu nejsou životaschopné. Pomocí „rescue“ experimentu jsme potvrdili RACK1 specifitu použitého CRISPR/Cas-9 vektoru. Získání RACK1 heterozygoti exprimující snížené množství RACK1 vykazují odlišnou morfologii oproti parentální linii, konkrétně byl pozorován vyšší výskyt dvoujaderných buněk a buněk s výrazně větší velikostí ve srovnání s WT. Vliv snížené exprese RACK1 na tvorbu stresových granulí jsme u těchto linií nepozorovali. Analýza této linie za stresu s využitím metody polyzomových profilů nepotvrdila vliv deplece RACK1 na translační odpověď buňky na stresové podmínky. Stejně tak úroveň fosforylace eIF2 za teplotního i oxidativního stresu byla stejná ve WT linii i „6H8“ linii se sníženou expresí RACK1.

## 5.2. Příprava a analýza MDCK linie exprimující lidskou variantu RACK1 fúzovanou s GFP

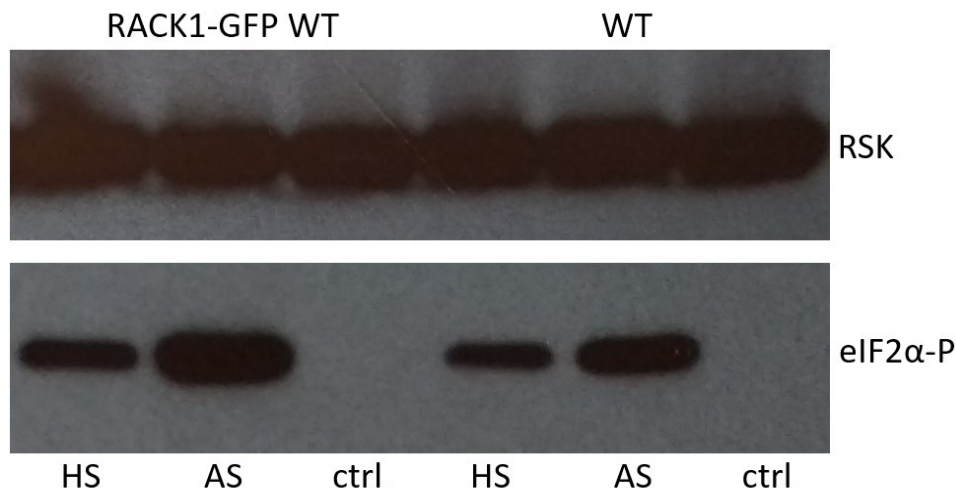
V předchozí kapitole jsme analyzovali vliv RACK1 na fenotyp MDCK buněk v kontextu jeho snížené exprese. Pro možnost dalšího studia funkce RACK1 bylo potřeba připravit si buněčné linie exprimující mutantní formy tohoto proteinu. Konkrétně jsme se zaměřili na dvě mutace. První z nich (S278A) zasahuje místo ve struktuře proteinu RACK1, na které se připojuje O-GlcNAc („O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine“), posttranslační modifikace vyskytující se v řadě proteinů stresových granulí. Souvislost mezi absencí této modifikace u RACK1 a jeho lokalizace do SG zatím není příliš objasněna. Druhá mutace (R36D K38E) se týká místa vazby RACK1 na ribozom. Z literatury je již známo, že tato mutace, jež zabráňuje vazbě RACK1 na ribozom, má za následek inhibici translace a nestabilitu RACK1 (Gallo *et al.*, 2018).

Mutovaný RACK1 byl do MDCK buněk vnesen transfekcí. Jednalo se o lidskou GFP značenou variantu tohoto proteinu (hRACK1-GFP). To však vyžadovalo předchozí ověření funkce nemutované (WT) varianty hRACK1-GFP v buňkách, tedy přípravu stabilních linií exprimujících obě varianty RACK1, endogenní (caRACK1) i ektopickou (hRACK1-GFP) a následně linii exprimující pouze hRACK1-GFP. Jak již bylo zmíněno, genové sekvence psiho a lidského RACK1 se mírně liší, avšak jejich aminokyselinové sekvence jsou identické. Proto bylo možné použít metodu CRISPR/Cas-9 za účelem delece pouze caRACK1 bez rizika zacílení hRACK1-GFP. Lidská varianta RACK1 by zároveň měla být schopna plně zastoupit funkci endogenního RACK1.

### 5.2.1. Příprava stabilní linie exprimující caRACK1 a hRACK1-GFP (WT):

Jako první krok jsme připravili stabilní linii MDCK buněk exprimující kromě endogenního RACK1 také lidskou variantu tohoto proteinu fúzovanou s GFP. Příprava probíhala transfekcí plazmidem obsahujícím hRACK1-GFP a následnou selecí pomocí antibiotika geneticinu a FACS. Takto připravená linie nevykazovala žádné změny fenotypu, exprese hRACK1-GFP tedy neměla žádný dominantně negativní vliv v těchto buňkách.

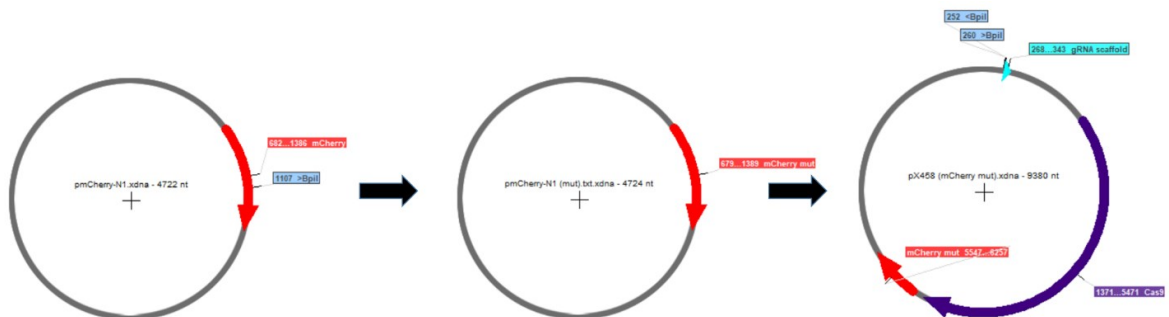
Také úroveň fosforylace eIF2 $\alpha$  se výrazně neliší od WT linie (viz obr. 22).



**Obrázek 22: Srovnání úrovně fosforylace eIF2 $\alpha$  ve RACK1-GFP WT a WT linii za teplotního a oxidativního stresu a za kontrolních podmínek.** Byly použity protilátky proti fosforylované eIF2 $\alpha$  a proti RSK (kontrola nanášky). Buňky jsme vystavili teplotnímu stresu („HS“) a oxidativnímu stresu vyvolaného působením arzenu („AS“). Vlevo RACK1-GFP WT linie, vpravo WT linie. Obě tyto linie vykazují fosforylaci eIF2 $\alpha$  za teplotního i oxidativního stresu, zatímco za kontrolních podmínek („ctrl“) jsme fosforylaci nezaznamenali ani u jedné z linií. Zároveň se u obou těchto linií zdá přítomna vyšší úroveň fosforylace eIF2 $\alpha$  za oxidativního stresu, ve srovnání s teplotním (už bylo pozorováno i u RACK1 KD linie, viz obr. 21). U linie RACK1-GFP WT se zdá úroveň fosforylace eIF2 $\alpha$  mírně vyšší u obou typů stresu. Doba expozice: 1 min.

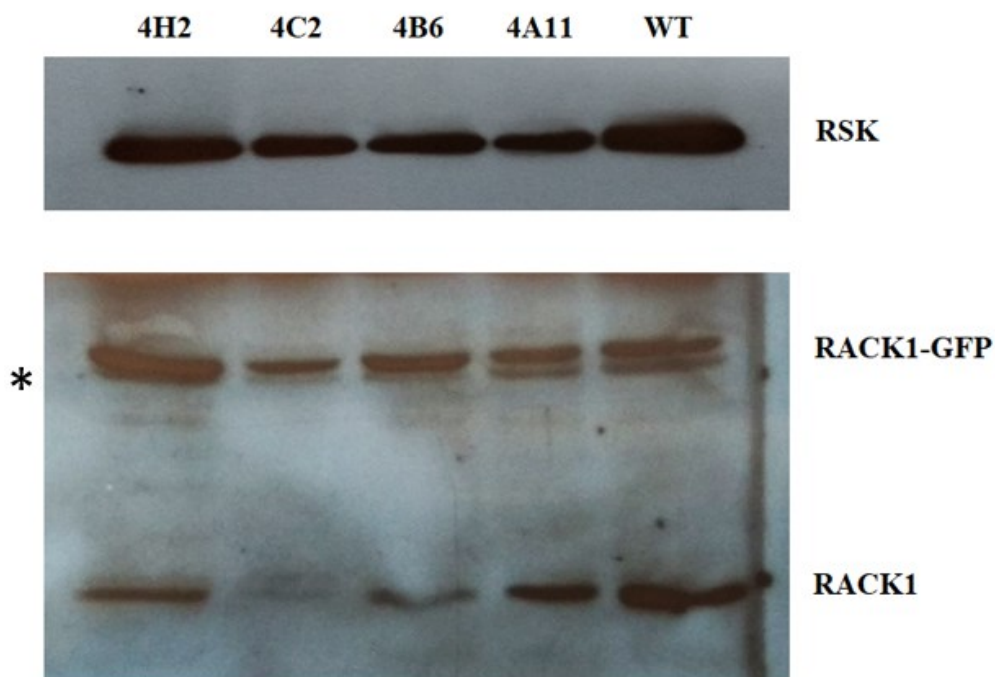
### 5.2.2. Příprava stabilní linie exprimující pouze hRACK1-GFP (WT)

Za účelem delece endogenního RACK1 ve stabilních liniích ektopicky exprimujících GFP značenou lidskou variantu RACK1, jsme zkonstruovali pX458-mCherry vektor. Původní pX458 vektor se v případě RACK1-GFP buněk nedal použít, protože kóduje GFP jako selekční marker po transfekci. Proto bylo třeba tuto GFP sekvenci vyměnit za sekvenci pro mCherry. Konstrukce nového vektoru probíhala nejprve tichou mutací v mCherry sekvenci pomocí PCR a následně výměnou sekvence GFP v originálním PX458 vektoru za takto mutované mCherry (viz obr. 23). Takto připravený vektor byl následně použit pro ligaci s gRNA sekvencemi. Byly použity stejné sekvence („4“ a „6“) jako v případě přípravy RACK1 KD linie.



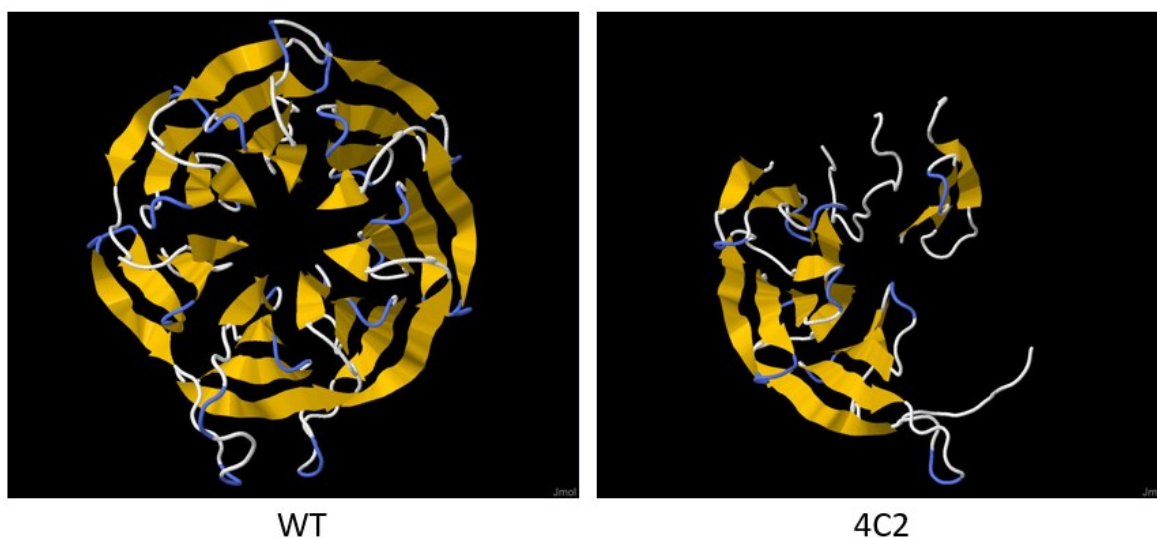
**Obrázek 23: Příprava PX458-mCherry vektoru pro delecí endogenního RACK1.** Genová sekvence pro mCherry obsahuje restrikční místo štěpené endonukleázou BpiI (používané pro vnesení gRNA), proto je třeba nejprve provést tichou mutaci v této sekvenci. Poté bylo možné vložit sekvenci mCherry do vektoru místo sekvence pro GFP.

Po provedení CRISPR/Cas9 jsme v těchto liniích pomocí metody Western Blot zkontrolovali míru exprese RACK1 a RACK1-GFP. U jedné z linií jsme nedetekovali endogenní variantu RACK1 (viz obr. 24).



**Obrázek 24: Ověření hladiny exprese RACK1 v buněčných liniích exprimujících hRACK1-GFP, u kterých byla provedena metoda CRISPR/Cas-9 za účelem delecí endogenního RACK1.** Byly použity protilátky proti RACK1 a RSK (sloužící jako kontrola nanášky). U linie „4C2“ je detekovatelná pouze GFP značená varianta RACK1, pravděpodobně zde tedy došlo k delecí endogenní varianty. \* označuje nespecifický band. Doba expozice: 5 min.

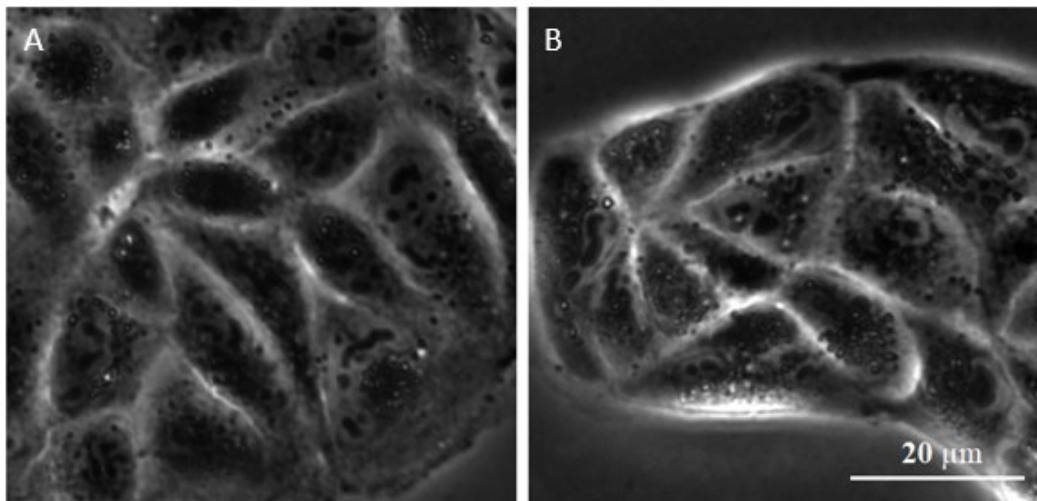
Pro potvrzení delece RACK1 v linii „4C2“ jsme pomocí PCR amplifikovali oblast RACK1 genu zacílenou pomocí CRISPR/Cas-9 a odeslali k sekvenování. Sangerovo sekvenování potvrdilo delecí endogenního RACK1, způsobenou delecí jednoho nukleotidu a posunem čtecího rámce. Získali jsme tedy MDCK linii exprimující pouze GFP značenou lidskou variantu RACK1. Na základě sekvence mutované RACK1 alely získané ze sekvenování jsme pomocí programu Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) predikovali strukturu proteinu vznikajícího podle této mutované sekvence (viz obr. 25).



**Obrázek 25: Porovnání struktury proteinu RACK1 ve WT linii (vlevo) a predikované struktury proteinu vznikajícího podle mutované sekvence v linii „4C2“ (vpravo).** Mutace v genu pro RACK1 způsobila posun čtecího rámce a vznik předčasného terminačního kodonu. Případný protein vznikající podle této mutované genové sekvence by měl výrazně zkrácenou aminokyselinovou sekvenci. Obrázky vytvořeny s pomocí programu Jmol (<http://jmol.sourceforge.net/>).

### 5.2.3. Morfologie MDCK buněk exprimujících pouze hRACK1-GFP

U linie „4C2“ jsme pomocí live cell mikroskopie sledovali morfologii buněk. Nebyly patrné žádné rozdíly oproti WT linii, nepozorovali jsme žádné dvoujaderné ani výrazně větší buňky (viz. obr. 26).

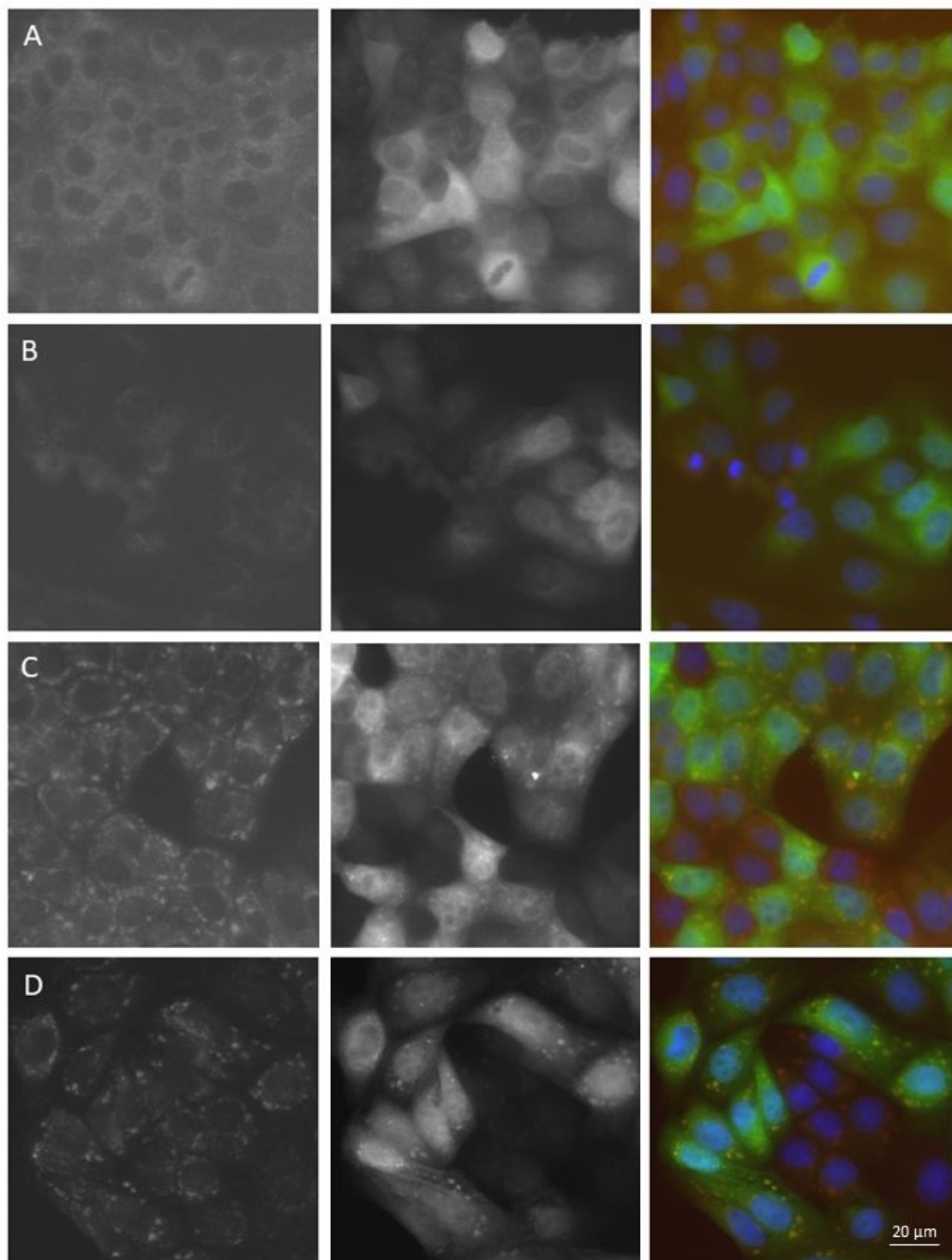


**Obrázek 26:** Snímky pořízené pomocí fázového kontrastu srovnávající morfologii buněk WT linie (A) a linie „4C2“ exprimující pouze hRACK1-GFP (B). Rozdíly v morfologii buněk u těchto linií nejsou patrné, což naznačuje, že fúze RACK1 s GFP nemá na morfologii buněk vliv a zároveň lidská varianta RACK1 je schopna zastoupit původní psi variantu tohoto proteinu.

#### **5.2.4. Tvorba stresových granulí u MDCK linie exprimující pouze hRACK1-GFP**

Pro další analýzu této buněčné linie jsme zvolili imunofluorescenční mikroskopii za účelem sledování tvorby stresových granulí během oxidativního stresu způsobeného arzenem. Použili jsme protilátku proti G3BP1 (viz výše), díky GFP značení jsme byli schopni sledovat také lokalizaci RACK1. Nepozorovali jsme žádný rozdíl v tvorbě stresových granulí oproti WT linii, tedy změny v počtu ani velikosti SG (viz obr. 27).





**Obrázek 27: Snímky z imunofluorescenční mikroskopie srovnávající tvorbu stresových granul u RACK1-GFP WT linie a linie „4C2“ exprimující pouze hRACK1-GFP.** Byla použita protilátka proti G3BP1 (vlevo), uprostřed je zobrazen RACK1-GFP a vpravo překryv signálů (červeně G3BP1, zeleně RACK1-GFP a modře DAPI znázorňující jádra buněk). Zobrazena WT linie za kontrolních podmínek (A), linie „4C2“ za kontrolních podmínek (B), WT za stresových podmínek (C) a „4C2“ za stresových podmínek (D). Buňky obou linií tvoří stresové granule, v obou případech je v SG přítomen RACK1.

### 5.2.5. Shrnutí

Připravili jsme si buněčnou linii exprimující endogenní caRACK1 a zároveň lidskou variantu RACK1 fúzovanou s GFP (hRACK1-GFP). U této linie jsme nepozorovali žádné změny ve fenotypu buněk. Dále jsme u této linie pomocí metody CRISPR/Cas-9 provedli delecí endogenního RACK1, čímž jsme získali linii exprimující pouze hRACK1-GFP. Zde jsme opět nezaznamenali žádné změny v morfologii buněk ani v tvorbě stresových granulí ve srovnání s WT linií. Stejný postup bude dále využit pro přípravu buněčných linií exprimujících mutantní formy lidské varianty RACK1.

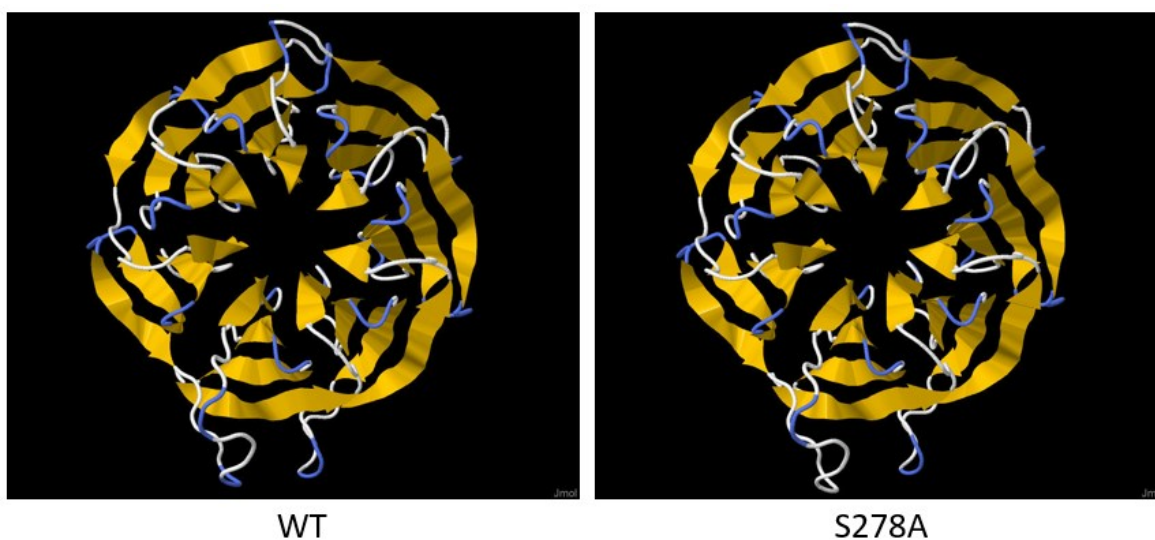


### 5.3. Příprava a analýza MDCK linie exprimující hRACK1-GFP S278A

Dále jsme si připravili MDCK linii exprimující mutantní RACK1. Jedná se o mutaci v predikovaném místě posttranslační modifikace O-GlcNAc. Tato modifikace se vyskytuje u řady proteinů vyskytujících se ve stresových granulích (Ohn *et al.*, 2008). U RACK1 je známá přítomnost O-GlcNAc modifikace, ale není potvrzeno přesné místo jejího výskytu v RACK1 struktuře ani souvislost mezi její přítomností či absencí a lokalizací RACK1 do SG.

Místo nejpravděpodobnějšího výskytu O-GlcNAc modifikace u RACK1 jsme predikovali pomocí programu NetOGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) na S278. Využili jsme metodu PCR pro mutaci S278 na A278 (AGC → GCC), tedy změnu aminokyseliny serinu na alanin, který neumožňuje přítomnost této posttranslační modifikace.

Na základě nové sekvence po mutaci S278A jsme pomocí programu Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) predikovali strukturu proteinu vznikajícího podle této mutované sekvence a nezaznamenali jsme rozdíl oproti struktuře RACK1 WT (viz obr. 28).



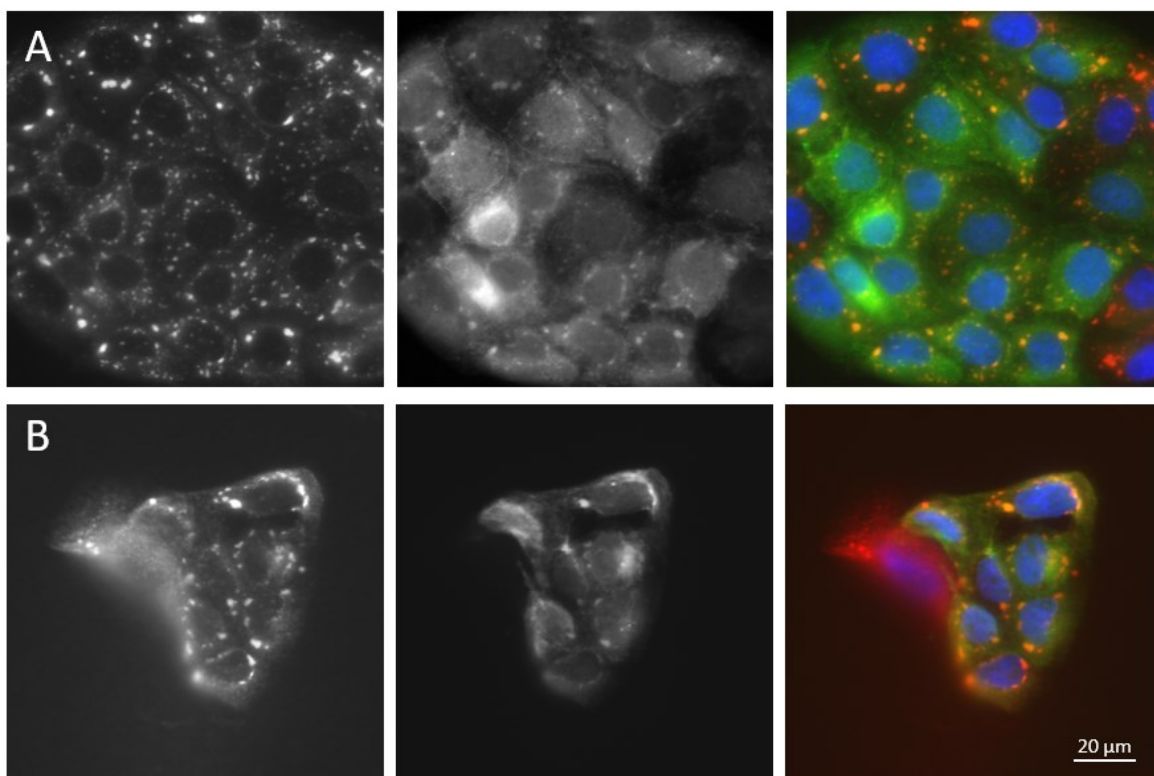
**Obrázek 28: Porovnání struktury RACK1 WT a predikované struktury RACK1 S278A.** Nezaznamenali jsme žádný rozdíl ve strukturách těchto proteinů. Obrázky vytvořeny s pomocí programu Jmol (<http://jmol.sourceforge.net/>).

### **5.3.1. Příprava stabilní linie exprimující caRACK1 a hRACK1-GFP S278A**

Dále jsme postupovali stejně jako v případě přípravy stabilní linie exprimující hRACK1-GFP WT, tedy transfekcí připraveným vektorem obsahujícím hRACK1-GFP S278A a následnou selekcí s využitím geneticinu a FACS.

### **5.3.2. Tvorba stresových granulí u linie exprimující caRACK1 a hRACK1-GFP S278A**

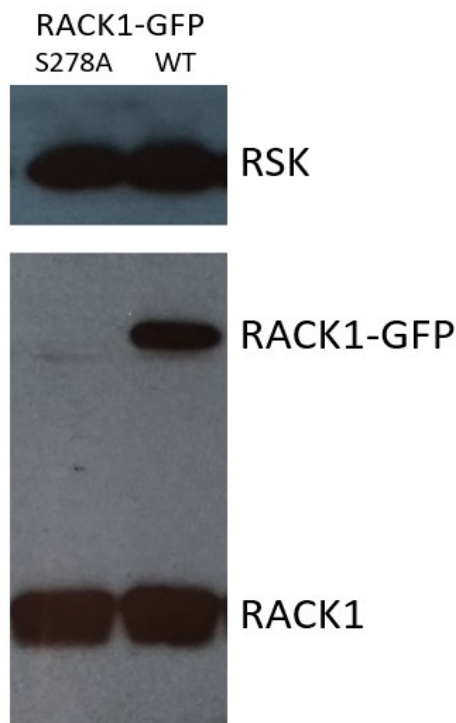
Sledovali jsme tvorbu SG za teplotního stresu, a to nejprve u stabilní linie exprimující obě varianty RACK1 – endogenní i mutovanou ektopickou. Byl použit teplotní stres, který na všechny buňky v rámci kolonie působí rovnoměrně, na rozdíl od arzenového stresu. Pozorovali jsme tvorbu stresových granulí srovnatelnou s WT linií, stejně tak lokalizaci hRACK1-GFP S278A do SG. Dále jsme zaznamenali úbytek buněk obsahujících mutantní hRACK1-GFP (viz obr. 29).



**Obrázek 29: Snímky z imunofluorescenční mikroskopie srovnávající tvorbu stresových granulí u RACK1-GFP WT linie a linie exprimující caRACK1 a hRACK1-GFP S278A:** Byla použita protilátka proti G3BP1 (vlevo), uprostřed je zobrazen hRACK1-GFP S278A a vpravo překryv signálů (červeně G3BP1, zeleně RACK1-GFP a modře DAPI znázorňující jádra buněk). Zobrazena WT linie za stresových podmínek (A) a linie exprimující caRACK1 a hRACK1-GFP S278A za stresových podmínek (B). Buňky obou linií tvoří stresové granule, v obou případech je v SG přítomen RACK1. V případě linií exprimujících hRACK1-GFP S278A jsme však pozorovali pouze malé množství buněk s GFP signálem, mutantní hRACK1 je tedy pravděpodobně v buňkách degradován.

Snížená či dokonce nulová exprese mutantní formy RACK1 v této linii několik týdnů po transfekci a FACS selekci byla zaznamenána pomocí WB (viz. obr. 30).

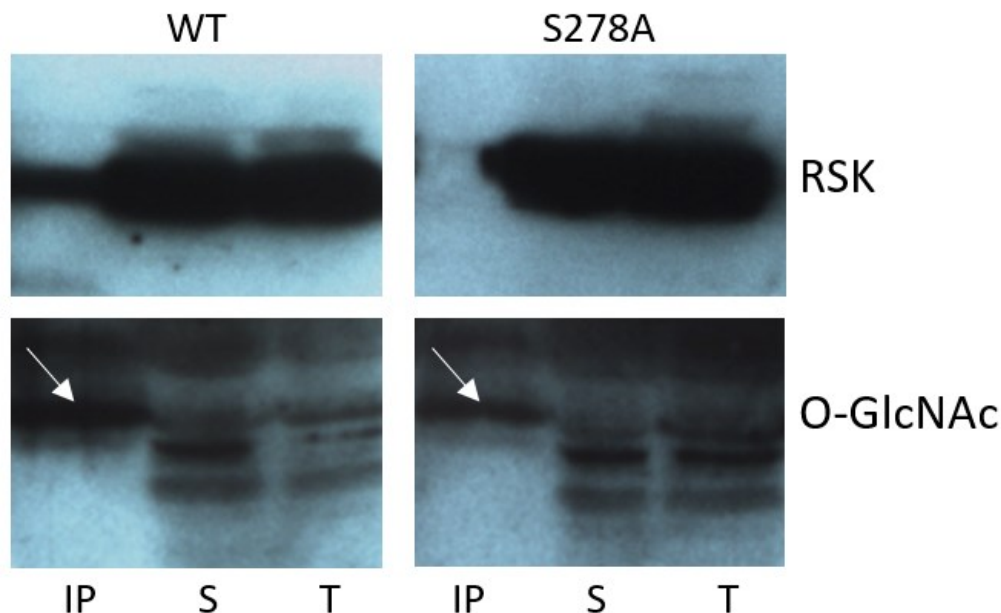
Po potvrzení či nalezení správného místa glykosylace bude u této linie následovat delece endogenního RACK1 pomocí CRISPR/Cas-9. Z důvodu postupně se snižující exprese mutantního RACK1-GFP bude nutné provést deleci endogenního RACK1 co nejdříve po transfekci a selekci.



**Obrázek 30: Ověření exprese RACK1 v liniích RACK1-GFP S278A (vlevo) a RACK1-GFP WT.** Byly použity protilátky proti RACK1 a RSK (kontrola nanášky). 2 měsíce po transfekci a selekci linie RACK1-GFP S278A vykazuje nulovou expresi mutovaného RACK1-GFP. Doba expozice: 2 min.

### 5.3.3. Ověření přítomnosti O-GlcNAc modifikace u hRACK1-GFP S278A

Přesné místo O-GlcNAc modifikace RACK1 ještě nebylo prokázáno (více vysvětleno v diskuzi), proto jsme ho predikovali *in silico* na Ser278. Sekvenováním jsme potvrdili přítomnost této mutace v námi připraveném konstruktů použitém pro přípravu stabilní linie. Následně jsme však pomocí metody Western Blot detekovali O-GlcNAc modifikaci nejen u purifikovaného RACK1-GFP WT, ale i u jeho mutované formy (viz obr. 31). Mutace S278A tedy nezabránila RACK1 podstoupit O-GlcNAc modifikaci.



**Obrázek 31: Ověření přítomnosti O-GlcNAc modifikace u purifikovaného hRACK1-GFP S278A.** Byly použity protilátky proti O-GlcNAc a RSK (kontrola nanášky). Vlevo linie hRACK1-GFP WT, vpravo hRACK1 S278A. Zleva vždy purifikovaný protein („IP“ - imunoprecipitace), nenavázaná frakce („S“ – supernatant), celkový lyzát („T“ – total). Původní hypotéza byla, že RACK1 mutovaný v místě S278 nebude schopen podstoupit O-GlcNAc modifikaci, výsledky však ukazují na přítomnost této modifikace nejen u WT linie, ale i u linie s mutovaným RACK1. Šipky označují glykosylovaný hRACK1-GFP. Doba expozice: 10 min.

#### 5.3.4. Shrnutí

Připravili jsme buněčnou linii exprimující caRACK1 WT a mutovaný hRACK1-GFP. Pomocí PCR byl hRACK1 před transfekcí mutován (S278A) v *in silico* predikovaném místě O-GlcNAc modifikace. Vzhledem k častému výskytu této modifikace u proteinů ve stresových granulích by absence této modifikace ve struktuře RACK1 mohla mít negativní vliv na lokalizaci RACK1 do SG.

Přítomnost této mutace jsme potvrdili sekvenováním. Po transfekci MDCK buněk a selekci jsme pomocí imunofluorescence pozorovali tvorbu stresových granulí u těchto linií. Počet ani velikost SG v buňkách exprimujících mutovaný RACK1 se nelišil od buněk WT linie a mutovaný hRACK1 byl v SG přítomen. Zároveň jsme si všimli výrazného úbytku buněk obsahujících takto mutantní RACK1. Pomocí metody Western Blot jsme poté pozorovali přítomnost O-GlcNAc modifikace i u takto mutovaného RACK1. Predikované místo této modifikace tedy pravděpodobně nebylo správné.

## 6. Diskuze

### 6.1. Buněčná linie se sníženou expresí RACK1 (RACK1 KD)

Za účelem analýzy vlivu proteinu RACK1 na morfologii buněk, translaci a reakci na stresové podmínky jsme si připravili buněčné linie s trvale sníženou hladinou exprese RACK1. Z literatury je již známý vliv deplece RACK1 na fenotyp některých buněčných linií. Například u potkaních fibroblastů (linie RAT-2) byla, po siRNA zprostředkované depleci RACK1, pozorována změna tvaru buněk z typicky protáhlého na kulatý či defekty v regulaci migrace a polarizace těchto buněk (Klímová *et al.*, 2016).

Studium vlivu úplné absence RACK1 na fenotyp eukaryotických buněk se provádí především na kvasinkových buňkách. V případě *S. cerevisiae* se jedná o ortolog Asc1p, jehož delece není pro kvasinky letální, nicméně má za následek odchylky v metabolismu buněk dané změnou regulace translace (Gerbasí *et al.*, 2004; Rachfall *et al.*, 2013). U studovaných mnohobuněčných organismů (*D. melanogaster* a myš) je RACK1 esenciální v embryonálním vývoji a jeho delece je letální v raných stádiích vývoje (Kadrmas *et al.*, 2007; Volta *et al.*, 2012). V případě heterozygotních myší s delecí RACK1 na jedné alele došlo k defektům v pigmentaci a ke snížení účinnosti proteosyntézy (Volta *et al.*, 2012). Delece RACK1 je letální také u rostlin (*A. thaliana*) (Guo a Chen, 2008).

Bylo však provedeno několik studií na lidské buněčné linii Hap1 vykazující nulovou expresi RACK1 (Jha *et al.*, 2017; LaFontaine *et al.*, 2019). To naznačuje, že některé buněčné linie se za určitých podmínek pravděpodobně mohou bez RACK1 obejít.

V námi používané MDCK buněčné linii jsme se o esencialitě RACK1 přesvědčili použitím CRISPR/Cas-9 metody. Pomocí pX458 vektoru obsahujícího dvě gRNA jsme zacílili do dvou různých oblastí RACK1 genu s cílem vytvořit buněčnou linii s KO (delece), případně s KD (snížení exprese) RACK1. Následná analýza exprese proteinu RACK1 identifikovala několik linií se sníženou expresí RACK1, avšak žádnou linii, která by tento protein zcela postrádala. Následnou sekvenací úseku RACK1 genu zacíleného Cas-9 (u zvolené linie „6H8“ s nižší expresí RACK1), jsme potvrdili na jedné alele RACK1 potvrdili mutaci, způsobující posun čtecího rámce a vznik předčasného terminačního kodonu. S největší pravděpodobností to následně vede k degradaci mRNA, přepsané podle této alely, pomocí mechanismu „nonsense mediated decay“, který zabraňuje translaci mRNA nesoucích předčasný terminační kodon. Vygenerovali jsme tedy heterozygotní buňky s pouze jednou funkční

RACK1 alelou. Následný experiment (provedl T. Groušl), kdy byl použit CRISPR/Cas-9 zacílený do RACK1 genu v těchto heterozygotních buňkách (tedy do jejich jediné funkční RACK1 alely) podpořil hypotézu o esenciální roli RACK1 v MDCK buňkách. Ani v tomto případě se totiž nepodařilo vygenerovat linii s úplnou absencí proteinu RACK1.

Dále jsme se přesvědčili, že i MDCK buňky jsou ovlivněny snížením exprese RACK1. U několika linií s RACK1 deplecí jsme zaznamenali výrazné změny fenotypu. V dalších experimentech jsme se pak zaměřili na jednu linii („6H8“), u které byly tyto změny nejvýraznější. Konkrétně jsme pozorovali výskyt výrazně větších a dvoujaderných buněk. Podíl dvoujaderných buněk v této linii dosahoval 7 %, zatímco u WT linie se s dvoujadernými buňkami téměř nesetkáme. Vzhledem k tomu, že je však známá určitá role RACK1 v buněčném cyklu, nebyly tyto výsledky nijak překvapivé. Např. po depleci ortologu RACK1 v *T. brucei* metodou RNA interference byla také pozorována inhibice buněčného růstu a akumulace jader v důsledku nedokončené cytokineze. Ovšem v případě trypanozom nebyl RACK1 popsán jako vazebný partner 40S podjednotky, pravděpodobně má zde tedy jiné funkce než regulaci translace (Rothberg *et al.*, 2006). RACK1 je rovněž vyžadován v recyklaci endozomů během cytokineze u *C. elegans*, kdy dochází k jeho interakci s dynactinem a tím k regulaci správného membránového transportu (Ai *et al.*, 2009). RACK1 také reguluje funkci kinázy Aurora-A a díky tomu je esenciální pro regulaci fáze mitózy a formování mitotického vřeténka. Zvýšení exprese RACK1 v HeLa buňkách vedlo k aktivaci kinázy Aurora-A, naopak snížení exprese RACK1 způsobilo opoždění vstupu většiny buněk do mitózy (Shen *et al.*, 2019).

Následně bylo třeba ověřit, zda tyto změny ve fenotypu buněk byly opravdu způsobeny nižší expresí RACK1. Toho jsme dosáhli pomocí tzv. „rescue“ experimentu, kdy jsme linii „6H8“ transfekovali vektorem obsahujícím lidskou variantu RACK1 fúzovanou s GFP (hRACK1-GFP). Aminokyselinová sekvence lidského RACK1 proteinu je identická s aminokyselinovou sekvencí psího RACK1, tyto proteiny by měly mít i shodnou funkci. Po transfekci a následné selekci jsme ověřili expresi RACK1 v této linii a potvrdili jsme, že tato linie exprimuje RACK1-GFP a malé množství endogenního RACK1 (ve srovnání s WT linií), tedy přesně tak, jak jsme očekávali. Morfologie buněk této linie připomínala morfologii buněk WT linie. Nepozorovali jsme dvoujaderné ani výrazně větší buňky, kterými se vyznačovala linie „6H8“ před „rescue“ experimentem. Odlišná morfologie buněk linie „6H8“ byla

tedy skutečně způsobena deplecí RACK1. Zároveň jsme ověřili, že hRACK1-GFP je opravdu schopen zastoupit v MDCK buňkách funkci endogenního RACK1. Fúze s GFP by také mohla mít vliv na funkci RACK1, což však naše dosavadní výsledky nenaznačují. Současně byl v naší laboratoři proveden stejný experiment, ale pro transfekci byl využit vektor obsahující hRACK1 fúzovaný s HA značkou, místo s GFP. Pomocí kvantitativní fázové mikroskopie byly buňky WT linie, „6H8“ linie a „6H8“ linie po „rescue“ spočítány podle velikosti. Tato kvantifikace potvrdila vyšší výskyt větších buněk v linii „6H8“ a návrat buněk této linie k velikosti odpovídající WT linii po „rescue“ experimentu.

Poté, co jsme potvrdili, že odlišný fenotyp „6H8“ linie je způsobený deplecí RACK1, sledovali jsme tvorbu stresových granulí (SG) u této linie. Nepředpokládali jsme, že snížená exprese RACK1 bude mít vliv na formování stresových granulí, protože RACK1 pravděpodobně nefunguje jako scaffold SG (tedy není nezbytný pro samotný proces formování SG). Při použití protilátky proti G3BP1, jedné ze základních složek SG, jsme nepozorovali rozdíly v počtu ani velikosti SG v „6H8“ linii, ve srovnání s WT linií. Využití protilátky proti G3BP1 nám však neumožnilo pozorovat přítomnost či nepřítomnost RACK1 v těchto SG. Protilátku proti RACK1 jsme sice také použili, ale ukázala se jako nevhodná pro imunofluorescenci. Pro následné experimenty proto bude třeba otestovat ještě další protilátky proti RACK1 nebo vizualizovat tento protein jiným způsobem. To je možné s využitím fluorescenčně nebo jinak značeného RACK1 (fluorescenčně např. díky fúzi s GFP, příp. pomocí HA-značky v kombinaci s protilátkou proti HA).

RACK1 je známý jako interakční partner malé ribozomální podjednotky. Někteří autoři jej dokonce popisují přímo jako součást ribozomu (Gerbasí *et al.*, 2004). Jako prostředník mezi proteiny signálních drah a komponenty translace RACK1 významným dílem přispívá k regulaci translace. Mutantní RACK1 deficientní ve vazbě na ribozom se ukázal jako nestabilní a zároveň došlo k inhibici translace (Gallo *et al.*, 2018). V buňkách exprimujících nižší množství RACK1 by tedy mohlo docházet k určitým změnám v průběhu translace. Pro další analýzu linie „6H8“ byl proto využita metoda polyzomových profilů, která umožňuje sledování translační aktivity buněk. Analyzovali jsme WT linie a „6H8“ linie za fyziologických i stresových podmínek. U obou linií jsme pozorovali negativní vliv oxidativního stresu na výskyt polyzomů. Nepřítomnost polyzomů poukazuje na inhibici translace, dalo by se



tedy říct, že deplece RACK1 nemá pravděpodobně vliv na inhibici translace v odpovědi buněk na stres. Během všech tří experimentů však došlo k velké degradaci RNA u linie „6H8“ (na rozdíl od WT linie, kde k degradaci nedošlo v ani jednom případě), proto zatím nemůžeme dospět k jasnému závěru ohledně translačního stavu buněk této linie. Experiment bude třeba ještě zopakovat a případně optimalizovat postup. Dále bude možné během této analýzy odebrat jednotlivé frakce a v nich pomocí Western Blotu detekovat přítomnost proteinů. Tím bychom mohli ověřit např. množství RACK1 přítomného na ribozomech v linii „6H8“, vliv RACK1 na vazbu dalších proteinů (např. PKC či některých translačních faktorů) na ribozomy či polyzomy, případně ověřit schopnost vazby značených či mutovaných RACK1 variant na ribozomy.

Kromě nepřítomnosti polyzomů vypovídá o stresem vyvolané inhibici translace také fosforylace  $\alpha$  podjednotky iniciačního faktoru eIF2. Tato fosforylace, způsobená stresem aktivovanými kinázami, se vyskytuje u všech eukaryot jako běžná odpověď na stresové podmínky a způsobí pozastavení translace ve fázi iniciace. Pomocí metody Western Blot jsme s využitím protilátky proti fosforylované  $\alpha$  podjednotce eIF2 detekovali stejnou úroveň této fosforylace u WT linie i u linie „6H8“. Buňky jsme vystavili působení teplotního i oxidativního stresu. Snížená exprese RACK1 v „6H8“ linii tedy nemá vliv na fosforylaci eIF2 $\alpha$  a tím pravděpodobně ani na následnou inhibici translace, což by mohlo doplnit předběžný výsledek z polyzomových profilů. Za kontrolních podmínek jsme nedetekovali přítomnost fosforylace eIF2 $\alpha$  ani u jedné z linií. Nejen že tedy linie „6H8“ odpovídá na přítomnost stresu stejným způsobem jako WT linie, ale zároveň i za kontrolních podmínek nevykazuje zvýšenou úroveň fosforylace eIF2 $\alpha$  naznačující přítomnost stresu. U obou analyzovaných linií jsme dále pozorovali nižší úroveň fosforylace za teplotního stresu, ve srovnání s oxidativním stresem vyvolaným působením arzenu. Tento výsledek jsme získali i v případě dalších analyzovaných linií (viz dále).

## **6.2. Buněčné linie exprimující hRACK1-GFP**

### **6.2.1. caRACK1 WT/hRACK1-GFP WT**

V předchozí kapitole byl popsán „rescue“ experiment buněk exprimujících nižší množství RACK1, spočívající v transfekci těchto buněk vektorem obsahujícím sekvenci pro lidský RACK1 fúzovaný s GFP. Díky návratu transfekovaných buněk od odlišného fenotypu

zpět k původnímu (WT) fenotypu, jsme mimo jiné potvrdili, že lidská varianta RACK1 je schopna v MDCK buňkách zastoupit endogenní variantu. Zároveň jsme nepozorovali negativní vliv fúze RACK1 s GFP na funkčnost RACK1.

Stejný vektor jako pro „rescue“ experiment jsme využili pro transfekci MDCK WT linií. Tím jsme získali buněčnou linii s expresí endogenního caRACK1 a zároveň lidského hRACK1-GFP. Buňky této linie podle očekávání nevykazovaly žádné změny v morfologii ani ve formování stresových granulí ve srovnání s buňkami WT linie. Stejně tak jsme ověřili přítomnost fosforylace za teplotního i oxidativního stresu (vyvolaného působením arzenu), stejně jako v případě WT linie a „6H8“ linie. Zde se dokonce úroveň fosforylace zdá mírně vyšší, ale to by bylo třeba ještě ověřit. Jak už bylo zmíněno, u všech třech analyzovaných linií (WT, „6H8“, RACK1-GFP WT) byla detekována nižší úroveň fosforylace eIF2 $\alpha$  během teplotního stresu, ve srovnání se stresem oxidativním. Podobný výsledek byl pozorován i při analýze translační odpovědi pomocí polyzomových profilů, kdy bylo po vystavení buněk teplotnímu stresu přítomno malé množství polyzomů, zatímco buňky, které prošly oxidativním stresem, neobsahovaly žádné polyzomy (WT linie a „6H8“ linie). Konkrétní vysvětlení pro tento výsledek nemáme, pravděpodobně námi použitý teplotní stres nemá pro buňky tak závažné účinky jako působení arzenu. Nižší úroveň eIF2 $\alpha$  fosforylace byla také detekována během studie z r. 2017, kdy autoři porovnávali složení a dynamiku SG v závislosti na typu použitého stresu u lidské buněčné linie Hap1. Konkrétně tímto rozdílem v úrovni fosforylace eIF2 $\alpha$  po působení teplotního stresu a arzenu se autoři nezabývali (Aulas *et al.*, 2017).

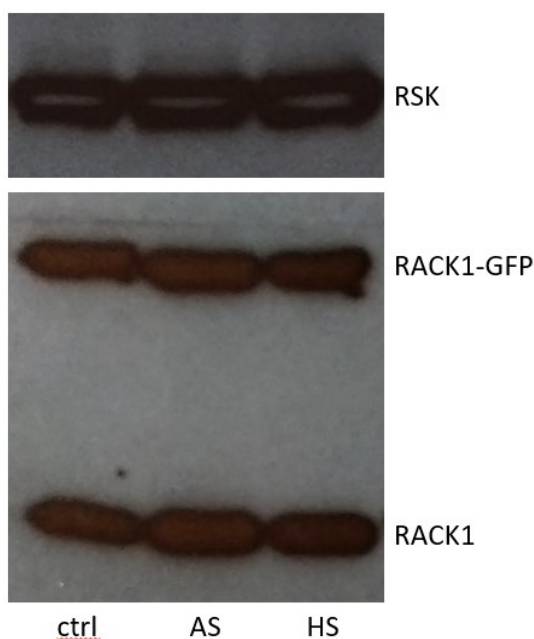
### 6.2.2. caRACK1 KO/hRACK1-GFP WT

Po ověření funkčnosti hRACK1-GFP v MDCK liniích exprimujících endogenní i ektopickou variantu RACK1 následovala příprava buněčné linie exprimující pouze hRACK1-GFP. K tomu byla potřeba delece endogenního RACK1 pomocí metody CRISPR/Cas-9. Využili jsme vektor pX458, stejně jako při přípravě buněčné linie se sníženou expresí RACK1 („6H8“). Tento vektor však obsahuje jako selekční marker GFP, proto se nedal použít v těchto liniích, exprimujících GFP ve fúzi s hRACK1. Místo GFP jsme tedy jako selekční marker využili mCherry, jehož genomická sekvence však obsahuje restriční místo štěpené endonukleázou BpiI, využitou pro ligaci s gRNA sekvencemi. Proto bylo třeba v tomto

úseku provést tichou mutaci pomocí PCR. Teprve potom byla takto mutovaná mCherry sekvence vložena do vektoru, ten byl štěpen BpI a ligován se 2 různými gRNA sekvencemi. Tímto vektorem byla transfekována linie caRACK1 WT/hRACK1-GFP WT. Pouze u jednoho analyzovaného klonu jsme následně zaznamenali pravděpodobnou delecí endogenního RACK1, což jsme poté ověřili sekvenováním. V genomické sekvenci endogenního RACK1 došlo díky štěpení Cas-9 k delecí jednoho nukleotidu, posunu čtecího rámce a vzniku předčasného terminačního kodonu. Tím byla pravděpodobně mRNA, vznikající podle této mutované sekvence, degradována před translací systémem „nonsense mediated decay“, podobně jako v případě „6H8“ linie s jednou mutovanou RACK1 alelou.

U této („4C2“) linie exprimující pouze hRACK1-GFP jsme následně sledovali morfologii buněk, která se nelišila od buněk WT linie. Dále jsme pozorovali tvorbu stresových granulí, kterou jsme srovnávali s linií caRACK1 WT/hRACK1-GFP WT. U obou těchto linií bylo možné detekovat hRACK1 díky jeho fúzi s GFP. Kromě toho byla použita protilátka proti G3BP1, jedné ze základních komponent SG. Velikost ani počet SG se v těchto liniích navzájem nelišil, v obou případech RACK1 lokalizoval do SG společně s G3BP1. Na základě dosud provedených experimentů se zdá, že lidský RACK1 fúzovaný s GFP je schopen zcela nahradit endogenní variantu RACK1 v MDCK buňkách.

Následný experiment pro detekci úrovně fosforylace eIF2 $\alpha$ , který byl spojený také s ověřením exprese RACK1 za stresu však v této linii odhalil přítomnost nejen hRACK1-GFP, ale také přibližně stejné množství caRACK1 (viz obr. 32). Pravděpodobně tedy došlo buď ke zpětné mutaci endogenního RACK1 na základě selekčního tlaku, případně ke kontaminaci RACK1-GFP WT linií. Pokud by se jednalo o první případ, naznačovalo by to možnost, že GFP-značená varianta RACK1 buňkám ze zatím neznámého důvodu vadí.



**Obrázek 32: Kontrola exprese RACK1 a RACK1-GFP v „4C2“ linii za kontrolních podmínek, oxidativního stresu (arzen, „AS“) a teplotního stresu („HS“).** Byly použity protilátky proti RACK1 a RSK (kontrola nanášky). Oproti očekávání byla zaznamenána exprese také endogenního RACK1, který by se v buňkách této linie neměl vyskytovat. Doba expozice: 1 min.

### 6.2.3. hRACK1-GFP S278A

Stejný postup jako v případě caRACK1 WT/hRACK1 WT linie jsme použili pro přípravu linie s expresí mutantní formy RACK1. Před transfekcí bylo ale třeba mutovat sekvenci hRACK1-GFP v rámci vektoru. Pomocí PCR bylo mutováno *in silico* predikované místo posttranslační modifikace O-GlcNAc (S278A). Naše hypotéza byla, že absence této modifikace ve struktuře RACK1 bude mít negativní vliv na lokalizaci RACK1 do stresových granulí (Ohn *et al.*, 2008).

Po transfekci MDCK buněk a selekci jsme pomocí imunofluorescence pozorovali tvorbu stresových granulí u těchto linií. Nejprve jsme si všimli výrazného úbytku buněk obsahujících takto mutantní RACK1. Převážily tedy buňky exprimující pouze endogenní RACK1. Mutace S278A tedy pravděpodobně vede k nestabilitě tohoto proteinu. Tento námi mutovaný serin je v nemutovaném stavu běžně fosforylován (Jha *et al.*, 2017; Uniprot: <https://www.uniprot.org/>), což by mohl být jeden z důvodů nestability mutovaného RACK1.

U těch několika buněk, které si hRACK1-GFP S278A ponechaly, jsme pozorovali, že takto mutovaný RACK1 se objevuje ve stresových granulích. Proto jsme se nejprve domnívali, že modifikace O-GlcNAc neovlivňuje schopnost RACK1 lokalizovat do SG.

Následně jsme však pomocí metody Western Blot pozorovali přítomnost O-GlcNAc modifikace i u takto mutovaného RACK1. Predikované místo této modifikace tedy pravděpodobně nebylo správné. Náš další cíl byl tedy purifikovat RACK1 a pomocí hmotnostní spektrometrie zjistit přesné místo modifikace. Dosud jsme purifikovali hRACK1-GFP WT, nepodařilo se nám však získat dostatečné množství tohoto proteinu.

V průběhu těchto experimentů se v odborné literatuře objevila publikace publikací zabývajících se O-GlcNAc modifikací u RACK1 a vlivem této modifikace na progresi hepatocelulárního karcinomu (HCC). Autoři zde rovněž využili hmotnostní spektrometrii pro predikci přesného místa této modifikace, které bylo stanoveno na Ser122. Díky bodové mutaci tohoto serinu na alanin potvrdili glykosylaci RACK1 v tomto místě, kdy mutantní RACK1 ztratil tuto modifikaci. Dále ukázali, že glykosylace RACK1 na Ser122 zajistila jeho vyšší stabilitu, vazbu na ribozom i interakci s PKC, stejně tak vedla ke zvýšení úrovně fosforylace eIF4E a translaci určitých protoonkogenů v HCC buňkách. Pokud byla O-GlcNAc modifikace RACK1 odstraněna, došlo *in vitro* k výraznému snížení rozvoje tumorigeneze, angiogeneze i metastáz. V této práci tedy měla O-GlcNAc modifikace Ser122 ve struktuře RACK1 určitý vliv na translaci spojenou s progresí hepatocelulárního karcinomu (Duan *et al.*, 2018).

Náš další krok bude tedy mutovat Ser122 v hRACK1-GFP a vytvořit stabilní linie exprimující takto mutovaný RACK1, postrádající O-GlcNAc modifikaci. V připravených liniích ověříme pomocí Western Blotu absenci této modifikace a pokud ji potvrdíme, budeme sledovat vliv této absence na lokalizaci RACK1 do stresových granulí.

Pokud potvrdíme absenci O-GlcNAc modifikace v těchto liniích, dále pomocí CRISPR/Cas-9 provedeme delecii endogenního RACK1. Získané linie tedy budou exprimovat pouze mutovaný hRACK1-GFP neobsahující glykosylaci a my budeme pozorovat, jak tím bude ovlivněn fenotyp těchto buněk, tvorba stresových granulí a translační odpověď buněk za fyziologických i stresových podmínek.

#### **6.2.4. caRACK1 KO/hRACK1-GFP R36D K38E**

Dále máme v plánu připravit stejným způsobem další linii s mutantním RACK1, konkrétně s mutací R36D K38E. Tato mutace negativně ovlivňuje schopnost vazby RACK1 na ribozom, přičemž tento mutant je nestabilní a zároveň dochází k inhibici translace (Gallo

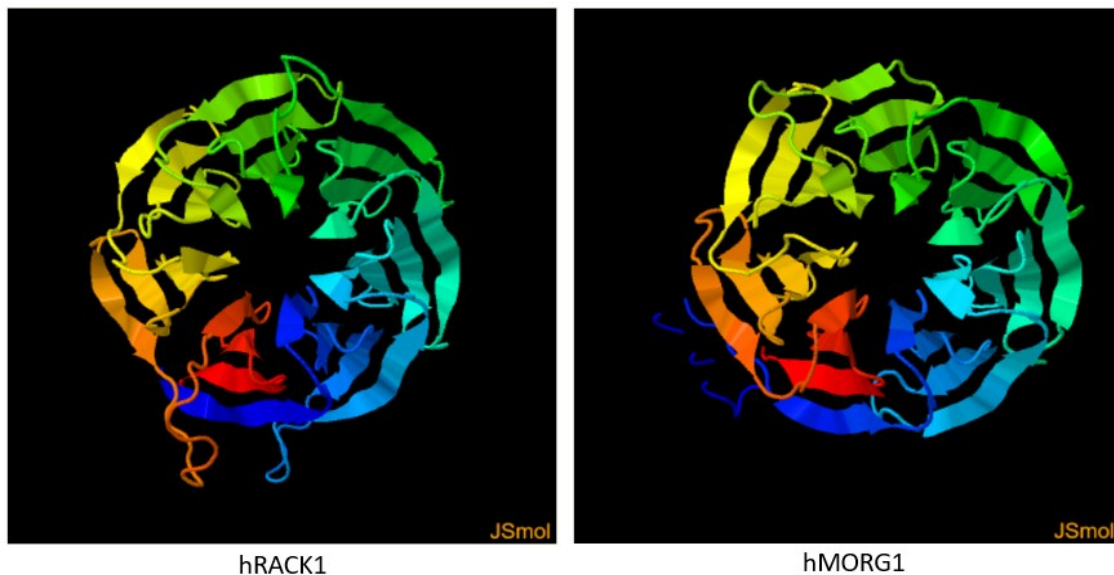
*et al.*, 2018). V těchto liniích budeme sledovat vliv této mutace na translaci a stresovou odpověď buněk, tedy i tvorbu stresových granulí. Nicméně předpokládáme, že příprava linie s delecí endogenního RACK1, exprimující tedy pouze hRACK1-GFP R36D K38E, možná bude problematická, vzhledem k nestabilitě takto mutovaného RACK1 (Gallo *et al.*, 2018).

### 6.3. MORG1

Kromě RACK1 bylo v naší laboratoři provedeno několik experimentů zaměřených na jiný člen WD40 rodiny, MORG1. Tento protein byl izolován jako vazebný partner proteinu MP1, fungujícího jako scaffold signální dráhy ERK. Kromě MP1 asociuje MORG1 s dalšími členy ERK dráhy, včetně Raf-1, MEK i ERK a usnadňuje jim tvorbu komplexů (Vomastek *et al.*, 2004). Tato pozorování naznačují, že MORG1 by mohl být schopen v některých funkcích zastoupit RACK1.

Srovnání terciární struktury RACK1 a MORG1 naznačuje, že tyto dva proteiny se navzájem podobají (viz obr. 33). Jejich aminokyselinové sekvence se však liší, včetně např. konzervovaného místa RACK1 klíčového pro jeho vazbu na ribozom (R36 K38). Mutace tohoto místa ve struktuře MORG1 napodobující toto vazebné místo RACK1 na ribozom by mohla vést k vazbě MORG1 na ribozom a jeho lokalizaci do stresových granulí. Zároveň místo O-GlcNAc modifikace RACK1 (Ser122) se však vyskytuje i ve struktuře MORG1.

Z výše uvedeného vyplývá, že experimenty provedené na MORG1 by mohly přispět k doplnění některých poznatků ohledně funkce RACK1.



**Obrázek 33: Srovnání 3D struktury příbuzných proteinů hRACK1 a hMORG1 pomocí programu Pyre2.** Stejně jako RACK1, struktura MORG1 je typická pro proteiny WD40 rodiny a blízká struktuře RACK1. Určité rozdíly mezi těmito dvěma proteiny jsou, např. poslední světle zelený  $\beta$ -list je v případě MORG1 kratší nebo oranžová smyčka přítomná u RACK1 chybí u MORG1.

## 7. Závěr

Připravili jsme si MDCK buněčné linie stabilně exprimující snížené množství RACK1 a linie exprimující jeho mutantní formy. Díky experimentům provedeným na těchto liniích jsme dospěli k následujícím závěrům:

- Snížení exprese RACK1 v MDCK buňkách vede k zvýšení výskytu pomaleji rostoucích a často výrazně větších a dvoujaderných buněk, což naznačuje defekt v cytokinezi
- Snížení exprese RACK1 nemá vliv na úroveň fosforylace eIF2 $\alpha$  za kontrolních ani stresových podmínek; analýza průběhu translace pomocí polyzomových profilů zatím neposkytla jednoznačné výsledky
- Tvorba stresových granulí (SG) v buňkách s deplecí RACK1 odpovídá tvorbě SG ve WT buňkách
- Exprese lidské varianty RACK1 fúzované s GFP (hRACK1-GFP) nemá vliv na fenotyp buněk u linií exprimujících zároveň tuto i endogenní variantu RACK1 (caRACK1); ovlivněna není pravděpodobně ani translační odpověď těchto buněk na stres
- Exprese pouze hRACK1-GFP po delecí caRACK1 nemá vliv na morfologii buněk ani na tvorbu SG; hRACK1-GFP lokalizuje do SG
- Buňky exprimující caRACK1 a hRACK1-GFP S278A takto mutovaný RACK1 pravděpodobně ve zvýšené míře degradují
- hRACK1-GFP S278A lokalizuje do SG
- hRACK1-GFP S278A obsahuje O-GlcNAc modifikaci



## 8. Přehled literatury

ADJIBADE, Pauline, Bryan SIMONEAU, Nassim LEDOUX, William-Naud GAUTHIER, Melisse NKURUNZIZA, Edouard W KHANDJIAN a Rachid MAZROUI, 2020. Treatment of cancer cells with Lapatinib negatively regulates general translation and induces stress granules formation. *PloS one* [online]. United States: Public Library of Science, **15**(5), e0231894. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:[10.1371/journal.pone.0231894](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231894)

\* ADVANI, V.M. a IVANOV, P., 2019. Translational Control under Stress: Reshaping the Translatome. *BioEssays* [online]. B.m.: John Wiley and Sons Inc., **41**(5). ISSN 15211878. Dostupné z: doi:[10.1002/bies.201900009](https://doi.org/10.1002/bies.201900009)

AI, Erkang, Daniel S POOLE a Ahna R SKOP, 2009. RACK-1 directs dynactin-dependent RAB-11 endosomal recycling during mitosis in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular biology of the cell* [online]. 2009/01/21 vyd. B.m.: The American Society for Cell Biology, **20**(6), 1629–1638. ISSN 1939-4586. Dostupné z: doi:[10.1091/mbc.e08-09-0917](https://doi.org/10.1091/mbc.e08-09-0917)

\* ANDERSON, P. a N. KEDERSHA, 2008. Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. **33**(3), 141–150. ISSN 09680004. Dostupné z: doi:[10.1016/j.tibs.2007.12.003](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.12.003)

\* ANDERSON, Paul, Nancy KEDERSHA a Pavel IVANOV, 2015. Stress granules, P-bodies and cancer. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms*. **1849**(7), 861–870. ISSN 1874-9399.

ARIMOTO, Kyoko, Hiroyuki FUKUDA, Shinobu IMAJOH-OHMI, Haruo SAITO a Mutsuhiro TAKEKAWA, 2008. Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nature Cell Biology* [online]. **10**(11), 1324–1332. ISSN 1476-4679. Dostupné z: doi:[10.1038/ncb1791](https://doi.org/10.1038/ncb1791)

AULAS, Anaïs, Marta M FAY, Shawn M LYONS, Christopher A ACHORN, Nancy KEDERSHA, Paul ANDERSON a Pavel IVANOV, 2017. Stress-specific differences in assembly and composition of stress granules and related foci. *Journal of cell science* [online]. 2017/01/17 vyd. B.m.: The Company of Biologists Ltd, **130**(5), 927–937. ISSN 1477-9137. Dostupné z: doi:[10.1242/jcs.199240](https://doi.org/10.1242/jcs.199240)

AULAS, Anaïs a Christine VANDE VELDE, 2015. Alterations in stress granule dynamics driven by TDP-43 and FUS: a link to pathological inclusions in ALS? *Frontiers in cellular neuroscience* [online]. B.m.: Frontiers Media S.A., **9**, 423–423. ISSN 1662-5102. Dostupné z: doi:[10.3389/fncel.2015.00423](https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00423)

BAUM, Sonja, Margarethe BITTINS, Steffen FREY a Matthias SEEDORF, 2004. Asc1p, a WD40-domain containing adaptor protein, is required for the interaction of the RNA-binding protein Scp160p with polysomes. *The Biochemical journal* [online]. **380**(Pt 3), 823–830. ISSN 1470-8728. Dostupné z: doi:[10.1042/BJ20031962](https://doi.org/10.1042/BJ20031962)

\* BOYE, E. a B. GRALLERT, 2020. eIF2 $\alpha$  phosphorylation and the regulation of translation. *Current Genetics* [online]. B.m.: Springer, **66**(2), 293–297. ISSN 14320983. Dostupné z: doi:[10.1007/s00294-019-01026-1](https://doi.org/10.1007/s00294-019-01026-1)

- \* BUCHAN, J. Ross a Roy PARKER, 2009. Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Outs of Translation. *Molecular Cell*. **36**(6), 932–941. ISSN 1097-2765.
- CAO, X.-X., J.-D. XU, J.-W. XU, X.-L. LIU, Y.-Y. CHENG, W.-J. WANG, Q.-Q. LI, Q. CHEN, Z.-D. XU a X.-P. LIU, 2010. RACK1 promotes breast carcinoma proliferation and invasion/metastasis in vitro and in vivo. *Breast Cancer Research and Treatment* [online]. **123**(2), 375–386. ISSN 01676806. Dostupné z: doi:[10.1007/s10549-009-0657-x](https://doi.org/10.1007/s10549-009-0657-x)
- CARRILLO, D., Ruiz, R., CHANDRASEKARAN, M., NILSSON, T., CORNVIK, C.W., LIEW, S.M., TAN a J., 2012. Structure of human Rack1 protein at a resolution of 2.45 Å. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* [online]. **68**(8), 867–872. ISSN 17443091. Dostupné z: doi:[10.1107/S1744309112027480](https://doi.org/10.1107/S1744309112027480)
- COYLE, Scott M, Wendy V GILBERT a Jennifer A DOUDNA, 2009. Direct link between RACK1 function and localization at the ribosome in vivo. *Molecular and cellular biology* [online]. 2008/12/29 vyd. B.m.: American Society for Microbiology (ASM), **29**(6), 1626–1634. ISSN 1098-5549. Dostupné z: doi:[10.1128/MCB.01718-08](https://doi.org/10.1128/MCB.01718-08)
- DANG, Yongjun, Nancy KEDERSHA, Woon-Kai LOW, Daniel ROMO, Myriam GOROSPE, Randal KAUFMAN, Paul ANDERSON a Jun O LIU, 2006. Eukaryotic initiation factor 2alpha-independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A. *The Journal of biological chemistry*. United States: American Society for Biochemistry and Molecular Biology, **281**(43), 32870–32878. ISSN 0021-9258.
- DENG, Yue-Zhen, Fan YAO, Jing-Jing LI, Zheng-Fa MAO, Ping-Ting HU, Ling-Yun LONG, Guo LI, Xiao-Dan JI, Shuo SHI, Dong-Xian GUAN, Yuan-Yuan FENG, Lei CUI, Dang-Sheng LI, Yong LIU, Xiang DU, Ming-Zhou GUO, Li-Yan XU, En-Min LI, Hong-Yang WANG a Dong XIE, 2012. RACK1 Suppresses Gastric Tumorigenesis by Stabilizing the  $\beta$ -Catenin Destruction Complex. *Gastroenterology*. B.m.: Elsevier Inc., **142**(4), 812–823. ISSN 0016-5085.
- DUAN, F. ( 1, 2 ), H. ( 1 WU 2 ), D. ( 1 JIA 2 ), W. ( 1 WU 2 ), S. ( 1 REN 2 ), L. ( 1 WANG 2 ), S. ( 1 SONG 2 ), X. ( 1 GUO 2 ), Y. ( 1 RUAN 2 ), J. ( 1 GU 2,4 ) a F. ( 3 ) LIU, 2018. O-GlcNAcylation of RACK1 promotes hepatocellular carcinogenesis. *Journal of Hepatology* [online]. **68**(6), 1191–1202. ISSN 16000641. Dostupné z: doi:[10.1016/j.jhep.2018.02.003](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.02.003)
- \* DUFF, Deirdre a Aideen LONG, 2017. Roles for RACK1 in cancer cell migration and invasion. *Cellular Signalling*. B.m.: Elsevier Inc., **35**, 250–255. ISSN 0898-6568.
- FEIGENBLUM, D a R J SCHNEIDER, 1996. Cap-binding protein (eukaryotic initiation factor 4E) and 4E-inactivating protein BP-1 independently regulate cap-dependent translation. *Molecular and cellular biology* [online]. **16**(10), 5450–5457. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:[10.1128/mcb.16.10.5450](https://doi.org/10.1128/mcb.16.10.5450)
- \* FULDA, Simone, Adrienne M. GORMAN, Osamu HORI a Afshin SAMALI, 2010. Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. *International Journal of Cell Biology* [online]. B.m.: Hindawi Limited, **2010**. ISSN 1687-8876. Dostupné z: doi:[10.1155/2010/214074](https://doi.org/10.1155/2010/214074)
- GALLO, S., RICCIARDI, N., MANFRINI, S., OLIVETO, P., CALAMITA, M., MANCINO, E. ( 3 ) PESCE, E. ( 4 MAFFIOLI 5 ), G. ( 4 TEDESCHI 5 ), M. ( 6 ) MORO, M. ( 6 ) CROSTI, V. ( 7 ) BERNO, M. ( 8 ) BOMBACI a S. ( 9 ) BIFFOA, 2018. Rack1 specifically regulates translation

through its binding to ribosomes. *Molecular and Cellular Biology* [online]. **38**(23). ISSN 10985549. Dostupné z: doi:[10.1128/MCB.00230-18](https://doi.org/10.1128/MCB.00230-18)

\* GAO, Xiaomeng, Li JIANG, Yanling GONG, Xiaobing CHEN, Meidan YING, Hong ZHU, Qiaojun HE, Bo YANG a Ji CAO, 2019. Stress granule: A promising target for cancer treatment. *BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY* [online]. **176**(23), 4421–4433. ISSN 00071188. Dostupné z: doi:[10.1111/bph.14790](https://doi.org/10.1111/bph.14790)

GERBASI, Vincent R, Connie M WEAVER, Salisha HILL, David B FRIEDMAN a Andrew J LINK, 2004. Yeast Asc1p and mammalian RACK1 are functionally orthologous core 40S ribosomal proteins that repress gene expression. *Molecular and cellular biology* [online]. B.m.: American Society for Microbiology, **24**(18), 8276–8287. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:[10.1128/MCB.24.18.8276-8287.2004](https://doi.org/10.1128/MCB.24.18.8276-8287.2004)

GILKS, Natalie, Nancy KEDERSHA, Maranatha AYODELE, Lily SHEN, Georg STOECKLIN, Laura M DEMBER a Paul ANDERSON, 2004. Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Molecular biology of the cell* [online]. 2004/09/15 vyd. B.m.: The American Society for Cell Biology, **15**(12), 5383–5398. ISSN 1059-1524. Dostupné z: doi:[10.1091/mbc.e04-08-0715](https://doi.org/10.1091/mbc.e04-08-0715)

GOULET, Isabelle, Sophie BOISVENUE, Sophie MOKAS, Rachid MAZROUI a Jocelyn CÔTÉ, 2008. TDRD3, a novel Tudor domain-containing protein, localizes to cytoplasmic stress granules. *Human molecular genetics* [online]. 2008/07/15 vyd. B.m.: Oxford University Press, **17**(19), 3055–3074. ISSN 1460-2083. Dostupné z: doi:[10.1093/hmg/ddn203](https://doi.org/10.1093/hmg/ddn203)

GROSSO, Stefano, Viviana VOLTA, Leonardo SALA, Marina VIETRI, Pier MARCHISIO, Dorit RON a Stefano BIFFO, 2008. PKC beta II modulates translation independently from mTOR and through RACK1. *The Biochemical journal* [online]. **415**, 77–85. Dostupné z: doi:[10.1042/BJ20080463](https://doi.org/10.1042/BJ20080463)

GUILLEMOT, F, A BILLAULT a C AUFRAY, 1989. Physical linkage of a guanine nucleotide-binding protein-related gene to the chicken major histocompatibility complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **86**(12), 4594–4598. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:[10.1073/pnas.86.12.4594](https://doi.org/10.1073/pnas.86.12.4594)

GUO, Jianjun a Jin-Gui CHEN, 2008. RACK1 genes regulate plant development with unequal genetic redundancy in Arabidopsis. *BMC plant biology* [online]. B.m.: BioMed Central, **8**, 108–108. ISSN 1471-2229. Dostupné z: doi:[10.1186/1471-2229-8-108](https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-108)

\* GUZIKOWSKI, Anna R., Yang S. CHEN a Brian M. ZID, 2019. Stress-induced mRNP granules: Form and function of processing bodies and stress granules. *WILEY INTERDISCIPLINARY REVIEWS-RNA* [online]. **10**(3). ISSN 17577004. Dostupné z: doi:[10.1002/wrna.1524](https://doi.org/10.1002/wrna.1524)

\* HERSHEY, John W B, Nahum SONENBERG a Michael B MATHEWS, 2012. Principles of translational control: an overview. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* [online]. B.m.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **4**(12), a011528. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:[10.1101/cshperspect.a011528](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011528)

HUANG, Shih-Ling, Lien-Szu WU, Min LEE, Chin-Wen CHANG, Wei-Cheng CHENG, Yu-Sheng FANG, Yun-Ru CHEN, Pei-Lin CHENG a Che-Kun James SHEN, 2020. A robust TDP-43

knock-in mouse model of ALS. *Acta Neuropathologica Communications*. B.m.: BioMed Central, **8**(1), 1–19. ISSN 20515960.

CHAN, Ching-Ping, Kin-Hang KOK, Hei-Man Vincent TANG, Chi-Ming WONG a Dong-Yan JIN, 2013. Internal ribosome entry site-mediated translational regulation of ATF4 splice variant in mammalian unfolded protein response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. **1833**(10), 2165–2175. ISSN 0167-4889. Dostupné z: doi:[10.1016/j.bbamcr.2013.05.002](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.05.002)

CHOU, Y.-C. ( 1 ), Y.-K. ( 1 ) CHEN, S. ( 1 ) TSAI, F.M.J. ( 1 ) HSIEH, H.J. ( 1 ) LIU, T.-H. ( 1 ) HSEU a C.-C. ( 2 ) CHOU, 1999. Structure and genomic organization of porcine RACK1 gene. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* [online]. **1489**(2–3), 315–322. ISSN 01674781. Dostupné z: doi:[10.1016/S0167-4781\(99\)00213-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(99)00213-4)

IVANOV, Pavel, Chudinova ELENA M a Nadezhdina ELENA S, 2003. Disruption of microtubules inhibits cytoplasmic ribonucleoprotein stress granule formation. *Experimental Cell Research* [online]. **290**(2), 227–233. ISSN 0014-4827. Dostupné z: doi:[10.1016/S0014-4827\(03\)00290-8](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(03)00290-8)

JAIN, Saumya, Joshua R. WHEELER, Robert W. WALTERS, Anurag AGRAWAL, Anthony BARSIC a Roy PARKER, 2016. ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure. *Cell* [online]. **164**(3), 487–498. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:[10.1016/j.cell.2015.12.038](https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.038)

JANNOT, Guillaume, Sarah BAJAN, Nellie J GIGUÈRE, Samir BOUASKER, Isabelle H BANVILLE, Sandra PIQUET, Gyorgy HUTVAGNER a Martin J SIMARD, 2011. The ribosomal protein RACK1 is required for microRNA function in both *C. elegans* and humans. *EMBO reports* [online]. 2011/04/28 vyd. B.m.: Nature Publishing Group, **12**(6), 581–586. ISSN 1469-3178. Dostupné z: doi:[10.1038/embor.2011.66](https://doi.org/10.1038/embor.2011.66)

JHA, Sujata, Madeline G ROLLINS, Gabriele FUCHS, Dean J PROCTER, Elizabeth A HALL, Kira COZZOLINO, Peter SARNOW, Jeffrey N SAVAS a Derek WALSH, 2017. Trans-kingdom mimicry underlies ribosome customization by a poxvirus kinase. *Nature* [online]. 2017/06/21 vyd. **546**(7660), 651–655. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:[10.1038/nature22814](https://doi.org/10.1038/nature22814)

JOHNSON, Alex G., Christopher P. LAPOINTE, Jinfan WANG, Nicholas C. CORSEPIUS, Junhong CHOI, Gabriele FUCHS a Joseph D. PUGLISI, 2019. RACK1 on and off the ribosome. *RNA* [online]. **25**(7), 881–895. ISSN 13558382. Dostupné z: doi:[10.1261/rna.071217.119](https://doi.org/10.1261/rna.071217.119)

KADRMAS, Julie L., Mark A. SMITH, Stephen M. PRONOVOST a Mary C. BECKERLE, 2007. Characterization of RACK1 function in *Drosophila* development. *Developmental Dynamics* [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, **236**(8), 2207–2215. ISSN 1058-8388. Dostupné z: doi:[10.1002/dvdy.21217](https://doi.org/10.1002/dvdy.21217)

KEDERSHA, N L, M GUPTA, W LI, I MILLER a P ANDERSON, 1999. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *The Journal of cell biology* [online]. B.m.: The Rockefeller University Press, **147**(7), 1431–1442. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:[10.1083/jcb.147.7.1431](https://doi.org/10.1083/jcb.147.7.1431)

KLÍMOVÁ, Zuzana, Vojtěch BRÁBOREC, Miloslava MANINOVÁ, Josef ČÁSLAVSKÝ, Michael J. WEBER a Tomáš VOMASTEK, 2016. Symmetry breaking in spreading RAT2 fibroblasts requires the MAPK/ERK pathway scaffold RACK1 that integrates FAK, p190A-RhoGAP and

ERK2 signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. **1863**(9), 2189–2200. ISSN 0167-4889. Dostupné z: doi:[10.1016/j.bbamcr.2016.05.013](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.05.013)

KNUTSEN, Jon Halvor Jonsrud, Gro Elise RØDLAND, Cathrine Arnason BØE, Tine Weise HÅLAND, Per SUNNERHAGEN, Beáta GRALLERT a Erik BOYE, 2015. Stress-induced inhibition of translation independently of eIF2 $\alpha$  phosphorylation. *Journal of Cell Science* [online]. **128**(23), 4420. Dostupné z: doi:[10.1242/jcs.176545](https://doi.org/10.1242/jcs.176545)

KWON, Sohee, Yu ZHANG a Patrick MATTHIAS, 2007. The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response. *Genes & development* [online]. B.m.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **21**(24), 3381–3394. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:[10.1101/gad.461107](https://doi.org/10.1101/gad.461107)

LAFONTAINE, Ethan, Clare M. MILLER, Natasha PERMAUL, Alex G. JOHNSON, Elliot T. MARTIN a Gabriele FUCHS, 2019. Ribosomal protein RACK1 facilitates efficient translation of poliovirus and other viral IRESs. *bioRxiv* [online]. 659185. Dostupné z: doi:[10.1101/659185](https://doi.org/10.1101/659185)

\* LI, Yun R, Oliver D KING, James SHORTER a Aaron D GITLER, 2013. Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *The Journal of cell biology* [online]. B.m.: The Rockefeller University Press, **201**(3), 361–372. ISSN 1540-8140. Dostupné z: doi:[10.1083/jcb.201302044](https://doi.org/10.1083/jcb.201302044)

\* LINDQUIST, Susan, 1986. THE HEAT-SHOCK RESPONSE. *Annual Review of Biochemistry* [online]. B.m.: Annual Reviews, **55**(1), 1151–1191. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:[10.1146/annurev.bi.55.070186.005443](https://doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.005443)

LOSCHI, Mariela, Claudia C LEISHMAN, Neda BERARDONE a Graciela L BOCCACCIO, 2009. Dynein and kinesin regulate stress-granule and P-body dynamics. *Journal of cell science* [online]. 2009/10/13 vyd. B.m.: Company of Biologists, **122**(Pt 21), 3973–3982. ISSN 1477-9137. Dostupné z: doi:[10.1242/jcs.051383](https://doi.org/10.1242/jcs.051383)

MAJZOUB, Karim, Mohamed Lamine HAFIRASSOU, Carine MEIGNIN, Akira GOTO, Stefano MARZI, Antonina FEDOROVA, Yann VERDIER, Joëlle VINH, Jules A HOFFMANN, Franck MARTIN, Thomas F BAUMERT, Catherine SCHUSTER a Jean-Luc IMLER, 2014. RACK1 controls IRES-mediated translation of viruses. *Cell* [online]. **159**(5), 1086–1095. ISSN 1097-4172. Dostupné z: doi:[10.1016/j.cell.2014.10.041](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.041)

\* MALYS, N. ( 1 ) a J.E.G. ( 1 MCCARTHY 2 ), 2011. Translation initiation: Variations in the mechanism can be anticipated. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. **68**(6), 991–1003. ISSN 1420682X. Dostupné z: doi:[10.1007/s00018-010-0588-z](https://doi.org/10.1007/s00018-010-0588-z)

\* MARTINEAU, Y, R AZAR, C BOUSQUET a S PYRONNET, 2013. Anti-oncogenic potential of the eIF4E-binding proteins. *Oncogene*. B.m.: Springer Nature, **32**(6), 671–677. ISSN 09509232.

MAZROUI, Rachid, Rami SUKARIEH, Marie-Eve BORDELEAU, Randal J KAUFMAN, Peter NORTHCOTE, Junichi TANAKA, Imed GALLOUZI a Jerry PELLETIER, 2006. Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  phosphorylation. *Molecular biology of the cell* [online]. 2006/07/26 vyd. B.m.: The American Society for Cell Biology, **17**(10), 4212–4219. ISSN 1059-1524. Dostupné z: doi:[10.1091/mbc.e06-04-0318](https://doi.org/10.1091/mbc.e06-04-0318)

- MITRA, Joy a Muralidhar HEGDE, 2020. The Role of TDP-43 in Genome Repair and beyond in Amyotrophic Lateral Sclerosis. In: [online]. Dostupné z: doi:[10.5772/intechopen.92696](https://doi.org/10.5772/intechopen.92696)
- MOCHLY-ROSEN, D, H KHANER a J LOPEZ, 1991. Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **88**(9), 3997–4000. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:[10.1073/pnas.88.9.3997](https://doi.org/10.1073/pnas.88.9.3997)
- \* NIELSEN, Maja Holch, Rasmus Kock FLYGAARD a Lasse Bohl JENNER, 2017. Structural analysis of ribosomal RACK1 and its role in translational control. *Cellular Signalling*. **35**, 272–281. ISSN 0898-6568.
- NIEWIDOK, Benedikt, Maxim IGAEV, Abel PEREIRA DA GRACA, Andre STRASSNER, Christine LENZEN, Christian P RICHTER, Jacob PIEHLER, Rainer KURRE a Roland BRANDT, 2018. Single-molecule imaging reveals dynamic biphasic partition of RNA-binding proteins in stress granules. *The Journal of cell biology* [online]. 2018/02/20 vyd. B.m.: Rockefeller University Press, **217**(4), 1303–1318. ISSN 1540-8140. Dostupné z: doi:[10.1083/jcb.201709007](https://doi.org/10.1083/jcb.201709007)
- \* PAKOS-ZEBRUCKA, Karolina, Izabela KORYGA, Katarzyna MNICH, Mila LJUJIC, Afshin SAMALI a Adrienne M GORMAN, 2016. The integrated stress response. *EMBO reports* [online]. 2016/09/14 vyd. B.m.: John Wiley and Sons Inc., **17**(10), 1374–1395. ISSN 1469-3178. Dostupné z: doi:[10.15252/embr.201642195](https://doi.org/10.15252/embr.201642195)
- PARK, Ye-Jin, DONG WOOK CHOI, SANG WOO CHO, JAESEOK HAN, SIYOUNG YANG a CHEOL YONG CHOI, 2020. Stress Granule Formation Attenuates RACK1-Mediated Apoptotic Cell Death Induced by Morusin. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. B.m.: MDPI AG, **21**(5360), 5360–5360. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:[10.3390/ijms21155360](https://doi.org/10.3390/ijms21155360)
- \* PROUD, Christopher G., 2005. eIF2 and the control of cell physiology. *Protein Synthesis in Health and Disease* [online]. **16**(1), 3–12. ISSN 1084-9521. Dostupné z: doi:[10.1016/j.semcdb.2004.11.004](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2004.11.004)
- RACHFALL, Nicole, Kerstin SCHMITT, Susanne BANDAU, Nadine SMOLINSKI, Armin EHRENREICH, Oliver VALERIUS a Gerhard H BRAUS, 2013. RACK1/Asc1p, a ribosomal node in cellular signaling. *Molecular & cellular proteomics : MCP* [online]. 2012/10/15 vyd. B.m.: The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, **12**(1), 87–105. ISSN 1535-9484. Dostupné z: doi:[10.1074/mcp.M112.017277](https://doi.org/10.1074/mcp.M112.017277)
- RON, Dorit, CHE-HONG CHEN, JEREMY CALDWELL, LEE JAMIESON, ELISHA ORR a DARIA MOCHLY-ROSEN, 1994. Cloning of an Intracellular Receptor for Protein Kinase C: A Homolog of the  $\beta$  Subunit of G Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. B.m.: National Academy of Sciences of the United States of America, **91**(3), 839. ISSN 00278424.
- ROTHBERG, Karen G, Dara L BURDETTE, Joy PFANNSTIEL, Neal JETTON, Rashmi SINGH a Larry RUBEN, 2006. The RACK1 homologue from *Trypanosoma brucei* is required for the onset and progression of cytokinesis. *The Journal of biological chemistry* [online]. 2006/02/09 vyd. **281**(14), 9781–9790. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:[10.1074/jbc.M600133200](https://doi.org/10.1074/jbc.M600133200)

RUTKOVSKY, A.C. ( 1, 3 ), V.J. ( 1 ) FINDLAY, S.P. ( 1 ETHIER 3 ), E.S. ( 2 YEY 3 ), K. ( 3 ARMESON 6 ), S.T. ( 4 ) GUEST a R.C. ( 5 ) MUISE-HELMERICKS, 2019. Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein as an oncogene in breast cancer. *BMC Cancer* [online]. B.m.: BioMed Central Ltd., **19**(1). ISSN 14712407. Dostupné z: doi:[10.1186/s12885-019-5667-4](https://doi.org/10.1186/s12885-019-5667-4)

SENGUPTA, J. ( 1 ), R. ( 2 ) GURSKY, J. ( 2 FRANK 3 ), J. ( 4 ) NILSSON, P. ( 4 ) NISSEN a C.M.T. ( 5 ) SPAHN, 2004. Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nature Structural and Molecular Biology* [online]. **11**(10), 957–962. ISSN 15459993. Dostupné z: doi:[10.1038/nsmb822](https://doi.org/10.1038/nsmb822)

SFAKIANOS, Aristeidis P., Laura E. MELLOR, Yoke Fei PANG, Paraskevi KRITSILIGKOU, Hope NEEDS, Hussein ABOU-HAMDAN, Laurent DÉSAUBRY, Gino B. POULIN, Mark P. ASHE a Alan J. WHITMARSH, 2018. The mTOR-S6 kinase pathway promotes stress granule assembly. *Cell Death & Differentiation* [online]. **25**(10), 1766–1780. ISSN 1476-5403. Dostupné z: doi:[10.1038/s41418-018-0076-9](https://doi.org/10.1038/s41418-018-0076-9)

SHEN, Congcong, Hui HUA, Lixiong GU, Shuanglin CAO, Hengji CAI, Xiaodong YAO a Xiaodong CHEN, 2020. Overexpression of RACK1 Predicts Poor Prognosis in Melanoma. *JOURNAL OF CANCER* [online]. **11**(4), 795–803. ISSN 18379664. Dostupné z: doi:[10.7150/jca.36905](https://doi.org/10.7150/jca.36905)  
SHEN, Fangrong, Chunyin YAN, Ming LIU, Yahong FENG a Youguo CHEN, 2013. RACK1 promotes prostate cancer cell proliferation, invasion and metastasis. *MOLECULAR MEDICINE REPORTS* [online]. **8**(4), 999–1004. ISSN 17912997. Dostupné z: doi:[10.3892/mmr.2013.1612](https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1612)

SHEN, Suqin, Huan FENG, Yichen LE, Jun NI, Long YU, Jiaxue WU a Meirong BAI, 2019b. RACK1 affects the progress of G2/M by regulating Aurora-A. *Cell Cycle* [online]. B.m.: Taylor & Francis, **18**(18), 2228–2238. ISSN 1538-4101. Dostupné z: doi:[10.1080/15384101.2019.1642065](https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1642065)

\* SONENBERG, Nahum a Alan G HINNEBUSCH, 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* [online]. **136**(4), 731–745. ISSN 1097-4172. Dostupné z: doi:[10.1016/j.cell.2009.01.042](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.042)

TOURRIÈRE, Helene, Karim CHEBLI, Latifa ZEKRI, Brice COURSELAUD, Jean Marie BLANCHARD, Edouard BERTRAND a Jamal TAZI, 2003. The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *The Journal of cell biology* [online]. B.m.: The Rockefeller University Press, **160**(6), 823–831. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:[10.1083/jcb.200212128](https://doi.org/10.1083/jcb.200212128)

VOLTA, V. ( 1 ), A. ( 1 ) BEUGNET, S. ( 1 ) GALLO, L. ( 1 ) MAGRI, D. ( 1 ) BRINA, E. ( 1 PESCE 2 ), P. ( 1 ) CALAMITA, S. ( 1 BIFFO 2 ) a F. ( 3 ) SANVITO, 2012. RACK1 depletion in a mouse model causes lethality, pigmentation deficits and reduction in protein synthesis efficiency. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 1–12. ISSN 1420682X. Dostupné z: doi:[10.1007/s00018-012-1215-y](https://doi.org/10.1007/s00018-012-1215-y)

WAN, Huida, Qi WANG, Xiuting CHEN, Qiufang ZENG, Yanjiao SHAO, Houqin FANG, Xun LIAO, Hu-Song LI, Ming-Gang LIU, Tian-Le XU, Miaomiao DIAO, Dali LI, Bo MENG, Bin TANG, Zhuohua ZHANG a Lujian LIAO, 2019. WDR45 contributes to neurodegeneration through regulation of ER homeostasis and neuronal death. *AUTOPHAGY* [online]. ISSN 15548627. Dostupné z: doi:[10.1080/15548627.2019.1630224](https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1630224)

WANG, S. ( 1 ), M. ( 1 ) SHEN, X. ( 1 ) WEN, X.-R. ( 1 ) HAN, Y.-J. ( 1 ) WANG, S.-H. ( 1 ) FAN, J. ( 1 ZHUANG 2,3 ), Z.-F. ( 1 ) ZHANG, Q. ( 1 ) SHAN, M.-Q. ( 1 ) LI, B. ( 1 ) HU, C.-H. ( 1 ) SUN, D.-M. ( 1 ) WU, J. ( 1 ) LU, Y.-L. ( 1 ) ZHENG, X. ( 4 ) GE a Q.-M. ( 4 ) LEI, 2018.

Correlation of the expressions of IGF1R-RACK1-STAT3 and Bcl-xl in nasopharyngeal carcinoma with the clinicopathological features and prognosis of nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. B.m.: Wiley-Liss Inc., **119**(2), 1931–1941. ISSN 10974644. Dostupné z: doi:[10.1002/jcb.26354](https://doi.org/10.1002/jcb.26354)

YIN-LIAN CHA, PIN-DONG LI, LIN-JING YUAN, MEI-YIN ZHANG, YAO-JUN ZHANG, HUI-LAN RAO, HUI-ZHONG ZHANG, X F STEVEN ZHENG a HUI-YUN WANG, 2015. EIF4EBP1 overexpression is associated with poor survival and disease progression in patients with hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE* [online]. B.m.: Public Library of Science (PLOS), **10**(2), e0117493–e0117493. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:[10.1371/journal.pone.0117493](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117493)

ZHANG, L., Y. LV, Y. RONG, W. CHEN, Y. FANG, W. MAO, W. LOU, D. JIN a X. XU, 2019. Downregulated expression of RACK1 results in pancreatic cancer growth and metastasis. *OncoTargets and Therapy* [online]. B.m.: Dove Medical Press Ltd., **12**, 1007–1020. ISSN 11786930. Dostupné z: doi:[10.2147/OTT.S176101](https://doi.org/10.2147/OTT.S176101)

ZOU, X.-D. ( 1 ), X.-J. ( 1 ) HU, J. ( 1 ) MA, T. ( 1 ) LI, Z.-Q. ( 1 ) YE a Y.-D. ( 1 WU 2 ), 2016. Genome-wide Analysis of WD40 Protein Family in Human. *Scientific Reports* [online]. **6**. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:[10.1038/srep39262](https://doi.org/10.1038/srep39262)

\* označeny review